

THÈSE

PRÉSENTÉE A L'UNIVERSITÉ DE NANCY I

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

par

Régine HERBER

Sujet :

ÉTUDE DE LA CAROTÉNOGENÈSE CHEZ MUCOR HIEMALIS

soutenue le 30 Septembre 1974, devant la Commission d'Examen

MEMBRES DU JURY :

Président : M. J. P. GARNIER

Examineurs : MM. B. GROSS
M. PIERFITTE
G. TURIAN
J. VILLOUTREIX

THÈSE

PRÉSENTÉE A L'UNIVERSITÉ DE NANCY I

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

par

Régine HERBER

Sujet :

ÉTUDE DE LA CAROTÉNOGENÈSE CHEZ MUCOR HIEMALIS

soutenue le 30 Septembre 1974, devant la Commission d'Examen

MEMBRES DU JURY :

Président : M. J. P. GARNIER

Examineurs : MM. B. GROSS
M. PIERFITTE
G. TURIAN
J. VILLOUTREIX

THÈSE

PRÉSENTÉE A L'UNIVERSITÉ DE NANCY I

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

par

Régine HERBER

Séjour :

ÉTUDE DE LA CAROTÉNOGÈNÈSE
CHEZ MUCOR HIEMALIS



soutenue le 10 septembre 1974 devant la Commission d'examen

MEMBRES DU JURY :

Président : M. J. F. GARNIER

Examinateurs : MM. B. GROSS
M. PIERRE
G. TURIAN
J. VILLOUREUX

A tous les miens,

En témoignage de ma profonde affection.

AVANT-PROPOS

Monsieur le Professeur PIERFITTE m'a accueillie au laboratoire de Chimie Biologique où j'ai trouvé non seulement les moyens de mener à bien ce travail mais également le goût de la recherche. Je tiens à assurer Monsieur le Professeur PIERFITTE de ma très profonde reconnaissance.

J'exprime toute ma gratitude à Monsieur VILLOUTREIX, Maître de Recherche au C.N.R.S qui m'a proposé le sujet de cette thèse et a su me communiquer son enthousiasme pour la recherche.

Monsieur le Professeur TURIAN de l'Université de Genève m'a toujours réservé malgré ses multiples occupations un accueil bienveillant. Je le remercie très sincèrement pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à mes recherches et pour l'honneur qu'il me fait en participant à mon jury.

Je suis particulièrement reconnaissante à Monsieur le Professeur GARNIER pour l'aide qu'il m'a apportée dans les moments difficiles et pour l'honneur qu'il me fait en acceptant, malgré ses lourdes tâches, la présidence de ce jury.

Que Monsieur le Professeur GROSS qui a accepté de juger mon travail trouve ici l'expression de mes très vifs remerciements.

Ma reconnaissance va également à Monsieur REISSINGER au Laboratoire de Microbiologie et à Monsieur GRANGER du Laboratoire de Chimie Théorique pour leur compétence et l'aide bienveillante qu'ils m'ont apportées chacun dans leur domaine respectif.

Enfin, je tiens à remercier particulièrement tous mes collègues et amis du laboratoire de Chimie Biologique qui ont contribué par leur aide efficace et leur amitié à la réalisation de ce travail.

ABREVIATIONS

Pour alléger le texte, les abréviations suivantes ont été utilisées.

ATP	Adénosine triphosphate-5'
E.P	Ether de pétrole
E.S	Ether sulfurique
FAD	Flavine-adénine dinucléotide sous forme oxydée
FMN	Flavine mononucléotide sous forme oxydée
J	Constante de couplage
NAD	Nicotinamide-adénine dinucléotide sous forme oxydée
NADP	Nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate sous forme oxydée.
ppm	Parties par million
RMN	Résonance magnétique nucléaire
TMS	Tétraméthylsilane
δ	Déplacement chimique
ϵ	Coefficient d'extinction molaire
λ	Longueur d'onde exprimée en nm

SOMMAIRE

	Pages
<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>MATERIELS ET METHODES</u>	14
A.- MATERIELS	14
1) Microorganisme	14
2) Solvants	14
3) Adsorbants	14
B.- TECHNIQUES	15
1) Cultures	15
2) Extraction et identification des métabolites isolés de milieux de cultures	16
3) Extraction, séparation et dosage des caroténoïdes	17
4) Extraction et analyse des lipides	18
5) Extraction et dosage des ubiquinones	19
6) Extraction et dosage des flavines	19
7) Isolement des globules lipidiques	20
8) Techniques spectroscopiques	20
9) Microscopie électronique	21
 <u>CHAPITRE I : ETUDE DE LA CONFIGURATION DES CAROTENOIDES DE MUCOR HIEMALIS</u>	 22
A.- STEREOCHIMIE DU PHYTOENE	25
1) Spectres ultraviolets	26
2) Isomérisation	27

3) Spectres de masse	27
4) Spectres infrarouges	27
5) Spectres de résonance magnétique nucléaire du proton	28
6) Spectres de résonance magnétique nucléaire du ^{13}C	32
 B.- CONFIGURATION DU PHYTOFLUENE	 35
 <u>CHAPITRE II : INHIBITION DE LA CAROTENOGENESE</u>	 37
 A.- RECHERCHE D'INHIBITEURS DE LA CAROTENOGENESE	 38
1) Dérivés du biphényle	38
2) Composés à deux noyaux benzéniques séparés par un groupe d'atomes (R)	40
a) Diphénylamine et dérivés	41
b) Benzophénone et dérivés	41
c) Autres dérivés	41
3) Composés dont les noyaux benzéniques sont séparés par plus d'un groupe d'atomes	42
4) Composés à noyaux benzéniques condensés	42
5) Composés à hétérocycles azotés	42
6) Composés à un seul noyau benzénique	43
 B.- RELATION STRUCTURE-ACTIVITE DES INHIBITEURS DE LA CAROTENOGENESE	 43
1) Etude des métabolites de quelques inhibiteurs de la caroténogénèse	44
a) 2-hydroxybiphényle	44
b) 4-acétylbiphényle	46
c) Benzophénone	46
d) 9-fluorénone	47
e) Diphénylamine	47
f) Stilbène	47

2) Discussion	48
---------------	----

<u>CHAPITRE III : ACTION DES DIVERS INHIBITEURS ET DE LA LUMIERE SUR LA SYNTHÈSE DU PHYTOÈNE</u>	50
--	----

A.- ACTIVITE COMPAREE DE QUELQUES INHIBITEURS	53
B.- INFLUENCE DE LA LUMIERE SUR LA FORMATION DES ISOMERES DU PHYTOÈNE	56
C.- LEVEES D'INHIBITION DE LA CAROTENOGENESE	61

<u>CHAPITRE IV : SPECIFICITE D'ACTION DES INHIBITEURS DE LA CAROTENOGENESE</u>	65
--	----

A.- INFLUENCE DE LA FLUORENONE SUR LE LIPO- GENESE DE <u>MUCOR HIEMALIS</u>	67
B.- INFLUENCE DES INHIBITEURS DE LA CAROTENO- GENESE SUR LA SYNTHÈSE DES STEROLS	70
C.- INFLUENCE DES INHIBITEURS DE LA CAROTENO- GENESE SUR LA SYNTHÈSE DES UBIQUINONES	71
D.- INFLUENCE DES INHIBITEURS DE LA CAROTENO- GENESE SUR LA SYNTHÈSE DES FLAVINES	72
E.- INFLUENCE DE LA FLUORENONE SUR LA MORPHOLOGIE	74

<u>CHAPITRE V : INFLUENCE DE L'ANAEROBIOSE SUR LA FORMATION DES CAROTENOIDES ET DIFFERENTS COMPOSES LIPIDIQUES AINSI QUE SUR LA MORPHOLOGIE DE MUCOR HIEMALIS</u>	77
---	----

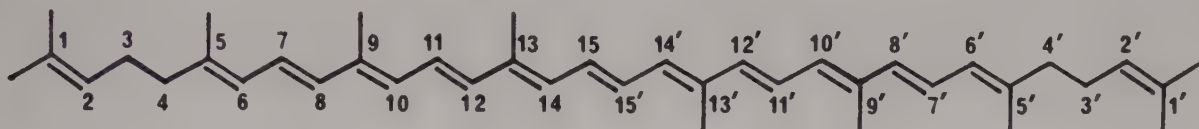
A.- INFLUENCE DE L'ANAEROBIOSE SUR LA CAROTENO- GENESE	80
---	----

1) Composition en caroténoïdes	80
--------------------------------	----

2) Recherche du lycopersène	82
B.- INFLUENCE DE L'ANAEROBIOSE SUR LA SYNTHÈSE DE DIVERS COMPOSÉS LIPIDIQUES	84
1) Stérols	84
2) Acides gras	85
C.- INFLUENCE DE L'ANAEROBIOSE SUR LA MORPHOLOGIE	88
 <u>CHAPITRE VI : LOCALISATION DES CAROTÉNOÏDES CHEZ MUCOR HIEMALIS</u>	 94
A.- RECHERCHE DES DIFFÉRENTS SITES D'ACCUMULATION DES CAROTÉNOÏDES CHEZ <u>MUCOR HIEMALIS</u>	97
B.- ÉTUDE DES GLOBULES LIPIDIQUES	98
1) Morphologie	98
2) Spectre d'absorption	99
3) Extractibilité des pigments	100
4) Composition chimique	101
 <u>CONCLUSION</u>	 113
 <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	 121

INTRODUCTION

Les caroténoïdes sont des substances appartenant aux tétraterpènes qui résultent de la condensation de 8 unités isopréniques de telle façon que les groupes méthyles au centre de la molécule soient en position 1,6 et les autres groupes méthyles non terminaux en position 1,5.



Lycopène

La plupart des caroténoïdes sont des substances colorées en jaune ou en rouge par suite de la présence dans la molécule d'un chromophore formé d'une chaîne plus ou moins longue de doubles liaisons conjuguées. Cependant, quelques caroténoïdes comme le phytoène (7, 8, 11, 12, 7', 8', 11', 12'-octahydro- ψ, ψ -carotène) et le phytofluène (7, 8, 11, 12, 7', 8'-hexahydro- ψ, ψ -carotène) possédant respectivement 3 et 4 doubles liaisons conjuguées ne présentent pas d'absorption dans le domaine du visible.

Si l'on considère le lycopène (ψ, ψ -carotène) comme étant le prototype des caroténoïdes, les autres en dérivent soit par introduction dans la molécule de groupements fonctionnels (hydroxyle, carboxyle, époxy, méthoxyle ...) soit par cyclisation de l'une ou des deux extrémités de la molécule. Par ailleurs, si certains caroténoïdes proviennent de la dégradation du squelette en C_{40} , d'autres découverts plus récemment

ont 45 et même 50 atomes de carbone (1). Enfin, à l'état naturel, quelques caroténoïdes comme la crocine, la phléixanthophylle, la corynexanthine, la myxoxanthophylle sont liés à des oses (2) et chez les Mycobactéries, les oses sont en outre estérifiés par des acides gras (3) .

Les caroténoïdes sont largement répandus dans la nature, mais à l'inverse des bactéries photosynthétiques et des végétaux chlorophylliens où ils sont toujours associés à la chlorophylle, de nombreux champignons et bactéries non photosynthétiques en sont dépourvus.

Du fait de la grande variété de structures chimiques des caroténoïdes, certains auteurs ont tenté de les utiliser comme critère taxinomique. Par exemple, la distribution des caroténoïdes chez les algues a permis d'établir ou de vérifier certaines relations phylogénétiques existant entre différentes classes de végétaux (4). En ce qui concerne les champignons, les conclusions d'études comparées des caroténoïdes sont d'un apport d'autant plus important pour la taxinomie qu'elles portent sur les réactions de biosynthèse plutôt que sur les produits résultants. A ce sujet, les informations sont encore incomplètes et certains résultats antérieurs mériteraient d'être repris à l'aide des méthodes modernes d'identification. Cependant, on peut noter par exemple chez les Phycomycètes, représentant la classe la plus primitive des champignons, que les Blastocladales contiennent principalement du γ -carotène (β ψ -carotène) (5) tandis que les Mucorales accumulent surtout du β -carotène (β , β -carotène) (6) . Cette constatation peut donc venir à l'appui de la classification déjà établie pour les Phycomycètes, selon laquelle les Blastocladales sont, dans l'échelle évolutive, plus primitives que les Mucorales.

Le rôle physiologique des caroténoïdes reste, pour l'instant, encore assez mal connu dans la plupart des cas. Cependant leur rôle dans la reproduction sexuée et le phototropisme des Mucorales ainsi que dans la protection vis-à-vis des photoxydations semble se confirmer.

La possibilité de leur intervention dans la reproduction sexuée des Mucorales est basée sur deux types d'observations : d'une part les gamétanges et les suspenseurs sont plus intensément colorés que le mycélium, d'autre part, les quantités de β -carotène sont différentes suivant le sexe (7). Selon BURNETT (8) la relation entre la teneur en caroténoïdes et les phénomènes sexuels reste difficile à définir . Ce point de vue corrobore les résultats de LING YOUNG qui avait montré dès 1929 que la quantité de caroténoïdes synthétisés par Mucor hiemalis est plus ou moins élevée selon la souche considérée mais sans aucune relation avec l'appartenance de celle-ci au signe (+) ou (-) (9) .

Chez d'autres Phycomycètes comme Allomyces, les faits paraissent beaucoup plus clairs puisque les gamétanges femelles sont incolores tandis que les gamétanges mâles sont colorés grâce à une synthèse active de γ -carotène (4). TURIAN (10) a cependant montré dès 1952 que l'inhibition de la caroténogénèse des gamétanges mâles d'Allomyces macrogynus par la diphénylamine, ne modifie ni la différenciation de ces organes ni le pouvoir fécondant des gamètes mâles devenus incolores et qui en sont issus. Tous ces résultats tendraient donc à montrer qu'il n'existe pas de relation bien étroite entre l'accumulation de caroténoïdes et la morphogénèse sexuelle.

Cependant, la découverte de la structure moléculaire des acides trisporiques (11) et de leur action spécifique sur la formation des progamétanges des souches (+) et (-) de Mucor mucedo (12), établit maintenant de façon certaine cette relation. AUSTIN (13) a montré que le β -carotène est un précurseur du principal acide trisporique (acide trisporique C) plus efficace que le mévalonate. De plus, cet acide exerce un rétrocontrôle positif sur la biosynthèse du β -carotène. Ceci permet donc de mieux comprendre pourquoi, lorsque les souches (+) et (-) sont cultivées ensemble, la synthèse des caroténoïdes est très supérieure à celle obtenue pour chacune des souches cultivée séparément (14).

En général, les champignons dépourvus de caroténoïdes ne répondent que très faiblement ou pas du tout à l'action de la lumière. C'est pourquoi, le phototropisme a été surtout étudié chez Phycomyces et Pilobolus connus pour synthétiser des quantités relativement importantes de caroténoïdes (15). Cependant des mutants de Phycomyces normalement déficients en β -carotène ou cultivés en présence de diphénylamine, conservent leur réponse phototropique. Il semblerait donc que le β -carotène n'intervienne pas en tant que photorécepteur primaire dans le phénomène de courbure du sporangiophore mais il est difficile de démontrer que les quantités même très minimales qui persistent après inhibition de la caroténogenèse ne jouent aucun rôle (16).

Notre étude ne concernant que les microorganismes non photosynthétiques, nous ne ferons que mentionner l'intervention des caroténoïdes dans les transferts d'énergie chez certains organismes photosynthétiques, ainsi que leur rôle de protecteurs vis-à-vis des photooxydations.

Si nos connaissances sur les différents rôles physiologiques des caroténoïdes restent fragmentaires, celles qui concernent leur biosynthèse ont très sensiblement progressé ces dix dernières années. Grâce à l'utilisation d'acide mévalonique stéréospécifiquement marqué, le mécanisme de formation des chaînes isopréniques par additions successives d'unités C_5 est maintenant bien connu. Il n'en est toutefois pas de même en ce qui concerne la suite des réactions qui se déroulent lors de la condensation de deux molécules de pyrophosphate de farnésyle dans le cas du squalène ou de deux molécules de pyrophosphate de géranylgéranyle dans le cas du phytoène.

On sait depuis les travaux de POPJAK (17) que la biosynthèse du squalène est un processus asymétrique en ce sens que les deux résidus farnésyles contribuent de façon inégale à l'élaboration du squalène. En effet, sur les deux molécules mises en jeu, une seule subit une élimination stéréospécifique de l'atome d'hydrogène pro S initialement porté par le carbone 5 de l'acide mévalonique. Cet atome d'hydrogène est remplacé ensuite de façon également stéréospécifique par l'ion H^+ provenant de NADPH.

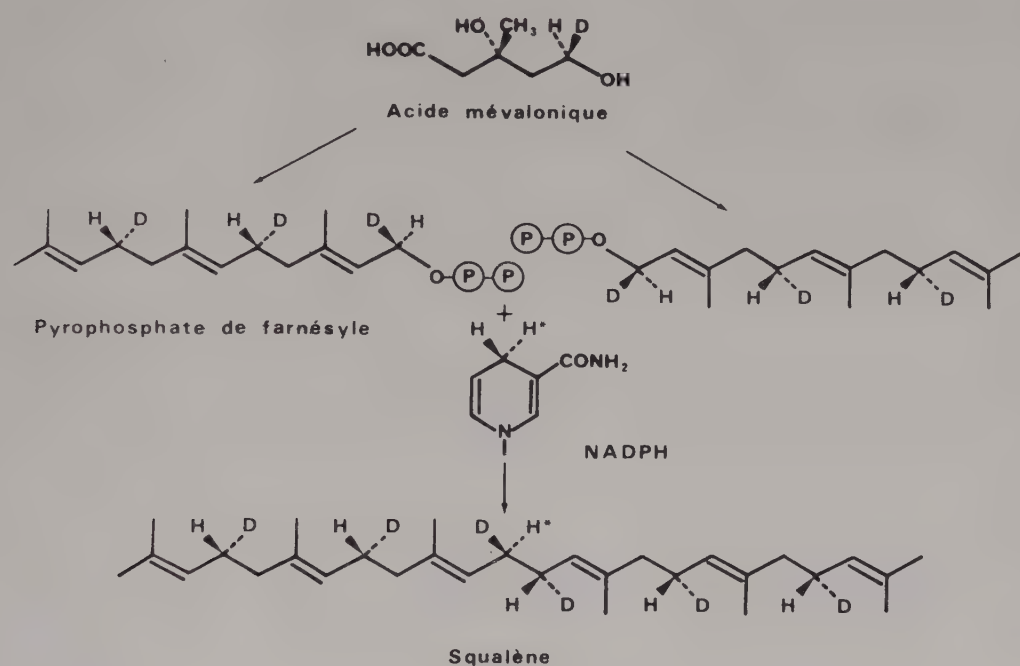
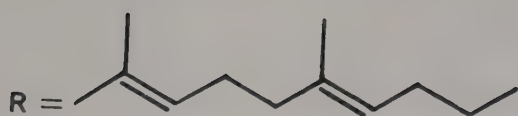
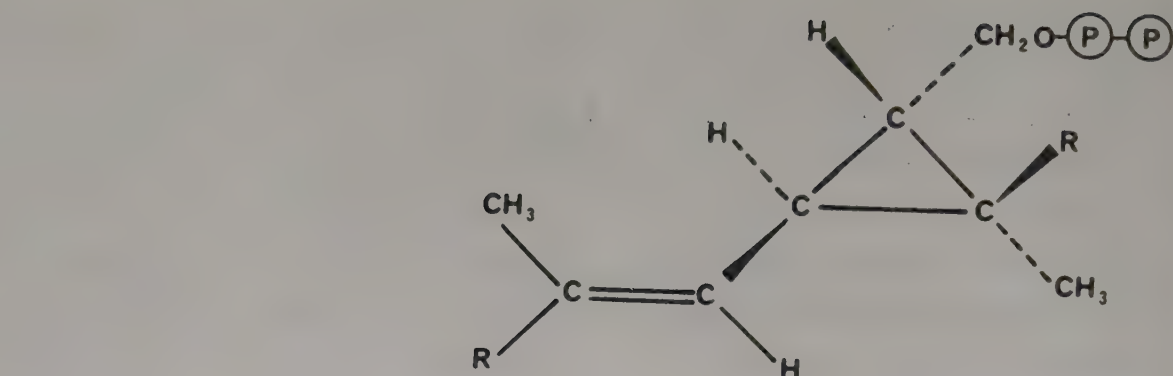


Schéma 1 : Stéréochimie de la biosynthèse du squalène à partir de pyrophosphate de farnésyle et de NADPH d'après POPJAK (17).

Le mécanisme de cette condensation n'est pas encore connu dans tous ses détails mais un intermédiaire entre le pyrophosphate de farnésyle et le squalène a été isolé (18). Celui-ci dénommé présqualène possède un cycle cyclopropanique au centre de la molécule et par incubation avec des microsomes de levure en présence de NADPH conduit effectivement au squalène.



Présqualène

L'étude du mode de formation du phytoène et d'une façon plus générale de tous les caroténoïdes, a largement bénéficié des résultats acquis et exposés ci-dessus pour le squalène. Il faut remarquer toutefois que le phytoène, à la différence du squalène, possède au centre de la molécule une double liaison et qu'en conséquence il ne devrait pas y avoir intervention de NADPH dans la condensation des deux molécules de pyrophosphate de géranylgéranyle (19, 20). Par ailleurs, la stéréospécificité de la perte d'atomes d'hydrogène se trouve confirmée par les résultats expérimentaux qui montrent qu'à partir d'acide mévalonique (5R)- $[2-^{14}\text{C}-5-^3\text{H}]$, la formation du phytoène s'accompagne d'une rétention de tous les atomes de tritium pro R (21).

Le schéma 2 illustre un des mécanismes possible de formation des isomères cis et trans du phytoène et fait apparaître en particulier que l'introduction de la double liaison centrale est obtenue dans les deux cas par l'élimination trans d'un proton et du reste S-enzyme.

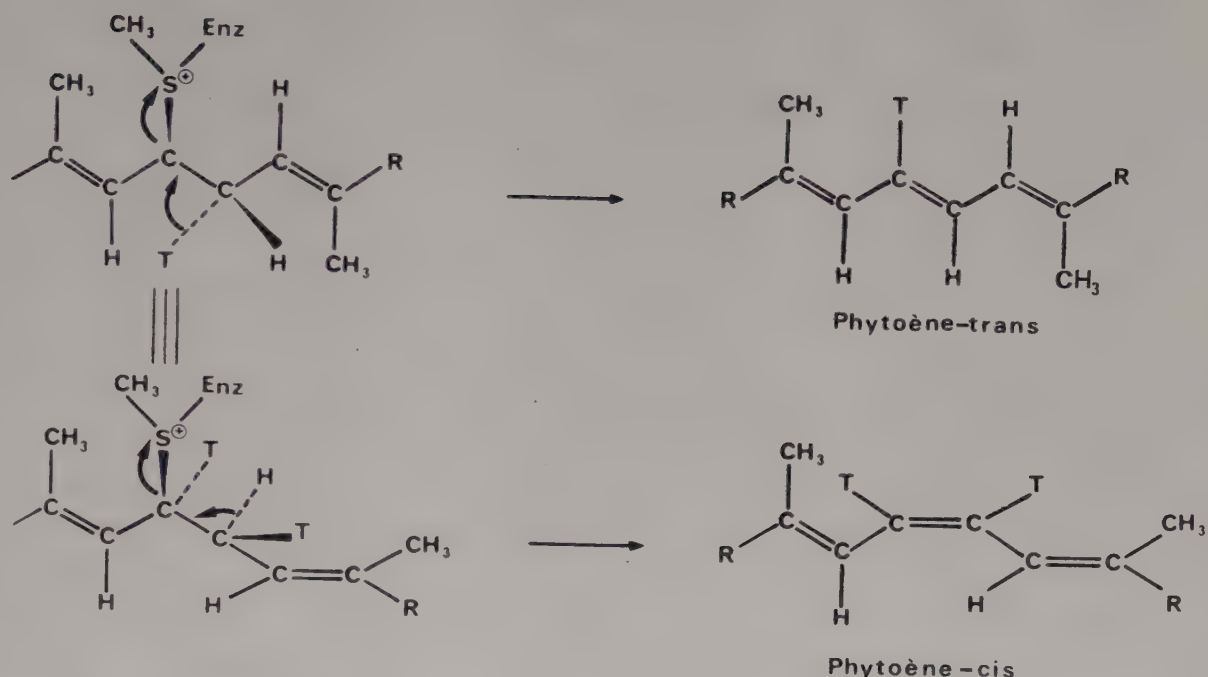


Schéma 2 : Mécanisme possible de la biosynthèse du phytoène adapté d'après GOODWIN (21).

L'isolement de préphytoène (22) homologue en C_{40} du présqualène montre que le schéma 2 ne représente certainement qu'une simplification importante du mécanisme réel de condensation de deux molécules de pyrophosphate de géranylgéranyle. Plus récemment, PORTER a obtenu, grâce à une squalène synthétase, extraite de *Saccharomyces cerevisiae*, la formation de prélycopersène à partir de pyrophosphate de géranylgéranyle (23). Si l'on admet une identité totale entre préphytoène et prélycopersène le schéma 3 pourrait représenter les différentes étapes de biosynthèse du phytoène.

Selon PORTER (23) la première étape consisterait en une attaque de type SN_2 de l'enzyme sur le carbone 1 du pyrophosphate de géranylgéranyle. Il en résulterait un déplacement du groupe pyrophosphate suivi d'une inversion de la configuration de l'atome de carbone 1.

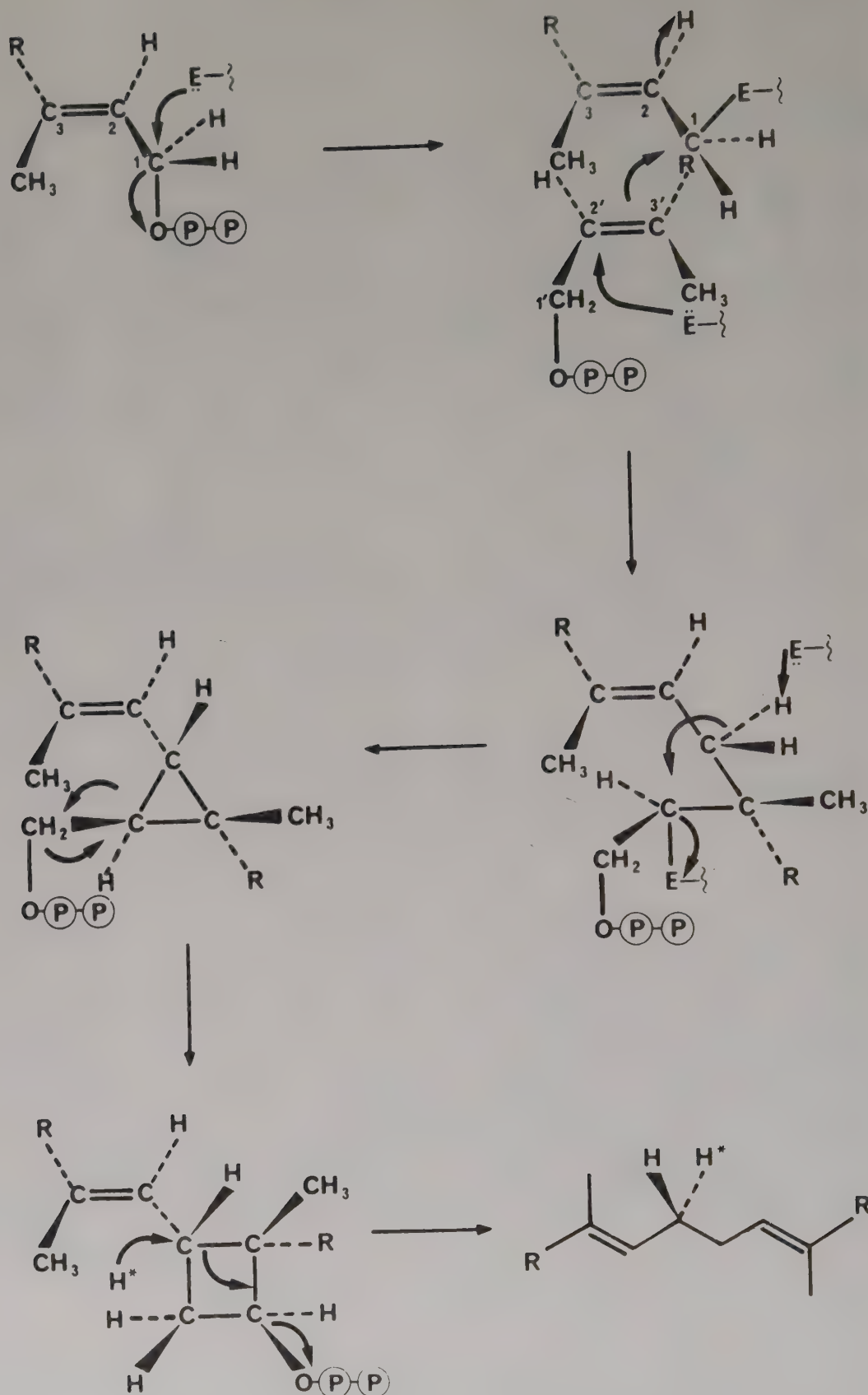


Schéma 3 : Mécanisme possible de la formation de pyrophosphat de prélycopersène et de sa réduction en lycopersèn par la squalène synthétase (23).

Le système π de l'atome de carbone 3' de la deuxième molécule de pyrophosphate de géranylgéranyle déplacerait l'enzyme de l'atome de carbone 1 du complexe enzyme-géranylgéranyle et ce déplacement serait facilité par une attaque de type SN_2 de l'enzyme. Le résultat de ce double déplacement serait la rétention de la stéréochimie de l'atome de carbone 1 des deux molécules de pyrophosphate de géranylgéranyle.

Au cours de la troisième étape, un proton de l'atome de carbone 1 serait éliminé par l'enzyme, ce qui conduirait à une attaque électrophile sur l'atome de carbone 2' du deuxième complexe enzyme-géranylgéranyle. Il en résulterait la création d'une nouvelle liaison entre les atomes de carbone 1 et 2' avec formation d'un cycle cyclopropanique et élimination simultanée de l'enzyme. Cette suite de réactions conduirait donc au pyrophosphate de prélycopersène.

L'étape finale consisterait alors en un réarrangement du cycle cyclopropanique avec migration du groupe pyrophosphate pour former un dérivé tautomère du cyclobutyle. Cette réaction serait suivie d'un transfert direct de H^+ provenant de NADPH et se terminerait par l'élimination du groupe pyrophosphate pour aboutir au lycopersène, analogue en C_{40} du squalène.

Ainsi se trouvent remis en question l'existence et le rôle du lycopersène. Dès 1961, GROB (24) l'avait mis en évidence au cours de l'incubation de pyrophosphate de géranylgéranyle avec un extrait enzymatique de Neurospora crassa. Cependant ce résultat n'a pas pu être confirmé par d'autres auteurs à partir du même microorganisme (25). Plus tard, du lycopersène a été isolé de carottes blanches et rouges (26) et tout récemment chez Halobacterium cutirubrum (27).

Si quelques divergences sont apparues entre les premiers résultats portant sur des organismes très différents et dues en grande partie à l'imperfection des méthodes analytiques, le schéma de filiation des caroténoïdes selon PORTE et LINCOLN (28, 29) est maintenant généralement accepté par tous les auteurs.

Le phytoène (7,8,11,12,7',8',11',12'-octahydro- ψ , ψ - carotène) est le précurseur de tous les caroténoïdes et conduit par désaturations successives au lycopène (ψ , ψ - carotène) par l'intermédiaire du phytofluène (7,8, 11,12,7',8'-hexahydro- ψ , ψ -carotène), du ζ -carotène (7,8,7',8'-tétrahydro- ψ , ψ -carotène) et du neurosporène (7,8-dihydro- ψ , ψ -carotène). Si le γ -carotène (β , ψ -carotène) s'avère être le précurseur immédiat du β -carotène (β , β - carotène) il existe toutefois deux voies possibles de biosynthèse conduisant au γ -carotène à partir du neurosporène (voir schéma 4). Dans le premier cas, la cyclisation se fait au niveau du lycopène obtenu par désaturation du neurosporène tandis que dans le deuxième cas, le neurosporène se cyclise immédiatement en β -zeacarotène, précurseur immédiat du γ -carotène.

Cette dernière voie serait prépondérante chez Phycomyces blakesleeanus, toutefois une cyclisation plus précoce des caroténoïdes a pu être mise en évidence puisque du 7,8,11,12-tétrahydrolycopène, isomère dissymétrique du ζ -carotène ainsi que son dérivé monocyclique, le 7',8',11',12'-tétrahydro- γ -carotène et précurseur possible du β -zeacarotène, ont été isolés (30).

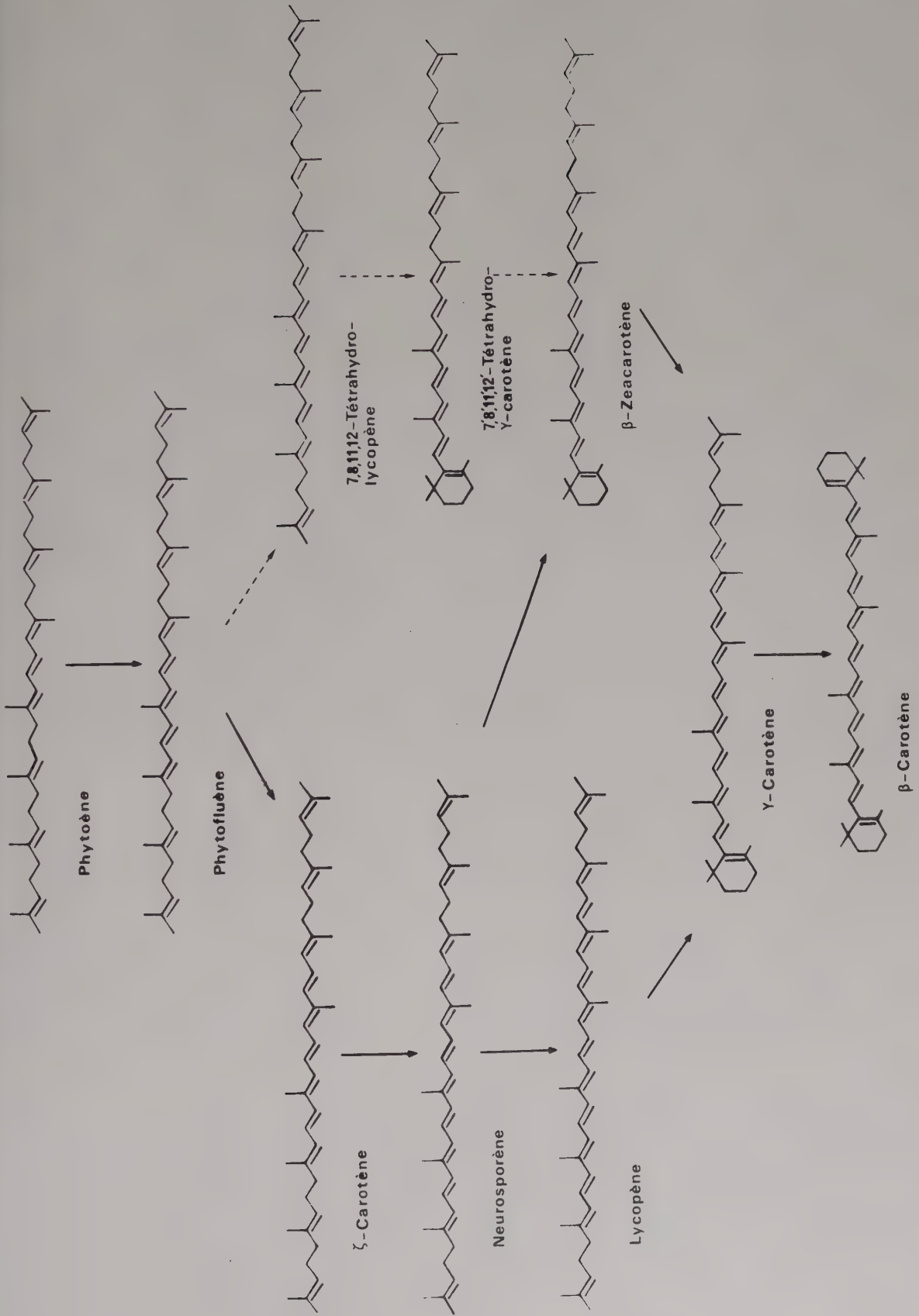


Schéma 4 : Voies possibles de cyclisation des caroténoïdes chez les champignons (30)



OBJECTIFS DU TRAVAIL

Après plusieurs années surtout consacrées à l'étude de la répartition des caroténoïdes dans le monde végétal et animal, les recherches se sont maintenant orientées en grande partie vers les mécanismes de formation de ces pigments. Cependant bien qu'elles aient beaucoup bénéficié des résultats acquis pour d'autres groupes de terpènes, ces recherches se heurtent à de grandes difficultés dues à la structure même des caroténoïdes. Ces composés caractérisés par des systèmes de doubles liaisons conjuguées sont en effet susceptibles de subir des isomérisations soit normalement au cours de leur biosynthèse, soit accidentellement au cours des manipulations. Ceci rend alors l'isolement et l'identification des pigments difficiles mais peut aussi fausser les interprétations formulées pour une séquence de réactions données.

L'étude de la stéréochimie des premiers termes en C_{40} des caroténoïdes et du phytoène en particulier est donc primordiale et fait l'objet du premier chapitre de notre travail.

Sous l'influence de différentes substances comme la diphénylamine et certains dérivés du biphenyle, la caroténogénèse de nombreux microorganismes est interrompue et le phytoène s'accumule. Ce phénomène qui a souvent été mis à profit soit pour obtenir une quantité importante de phytoène, soit pour montrer que ce dernier est précurseur des caroténoïdes, met en jeu un mécanisme qui n'est pas encore élucidé.

Dans le deuxième chapitre, nous tentons une approche de ce problème par la recherche d'une corrélation entre la structure moléculaire de différents composés chimiques et leur comportement vis-à-vis de la caroténogénèse.

On sait par ailleurs que la lumière influence la formation des pigments mais là encore, ni le mécanisme, ni le niveau auquel elle agit ne sont connus jusqu'à présent. On peut de plus se demander si la synthèse des précurseurs incolores en particulier du phytoène qui n'absorbe que dans l'ultraviolet de courte longueur d'onde, peut être perturbée par des variations d'éclairement. Il semble alors également important de vérifier dans quelle mesure les inhibiteurs qui provoquent l'accumulation du phytoène, sont susceptibles de modifier leur action en fonction de l'éclairement. L'étude de l'influence possible de la lumière sur la synthèse des pigments et en particulier du phytoène fait l'objet du troisième chapitre de ce mémoire.

L'introduction dans le milieu de culture d'un micro-organisme de substances xénobiotiques, n'entraîne pas en général la modification d'une seule réaction métabolique. C'est donc souvent à tort que l'on parle d'action spécifique d'une substance donnée et c'est pourquoi l'interférence des inhibiteurs de la caroténogenèse avec d'autres métabolismes et spécialement avec celui des lipides est envisagée dans le quatrième chapitre.

Différents auteurs ont montré que l'oxygène est nécessaire pour l'élaboration des caroténoïdes chez les micro-organismes non photosynthétiques, on peut donc envisager que l'anaérobiose puisse constituer un meilleur moyen de contrôle de la pigmentation que les inhibiteurs chimiques. Dans le cinquième chapitre nous exposons nos résultats concernant la privation en oxygène de Mucor hiemalis.

Enfin dans un sixième chapitre nous tentons de résumer une étude concernant la localisation des caroténoïdes au sein de la cellule.

MATERIELS ET METHODES

A.- MATERIELS

1) Microorganisme

L'organisme principalement utilisé dans ce travail est une souche de Mucor isolée des sols halomorphes de Lorraine. Cette souche peut être considérée comme une forme jaune de Mucor hiemalis (Wehmer) dont elle se distingue cependant par la dimension des spores. Les essais de croisements effectués avec M.hiemalis et également avec Mucor luteus (Linnemann) ne montrent que des hybridations imparfaites et l'appartenance de notre souche au type (+).

2) Solvants

L'éther de pétrole (E.P) est distillé entre 40°C et 60°C puis filtré sur une colonne de gel de silice Merck (0,2 à 0,8 mm) imprégné de 20% de nitrate d'argent de façon à le débarrasser des composés sulfurés et de diverses impuretés gênantes lors des chromatographies; dans certains cas, une sulfonation suivie d'une distillation élimine les hydrocarbures benzéniques. L'éther sulfurique (E.S) est séché et privé de peroxydes sur sodium. L'acétone est redistillée, et les autres solvants utilisés sont des produits purs pour analyse.

3) Adsorbants

Pour les chromatographies sur colonne des caroténoïdes nous utilisons l'alumine Merck qui, après neutralisation, est amenée à l'activité I selon Brockman. L'alumine basique Woelm

d'activité I est employée surtout pour la séparation des isomères du phytoène et l'alumine acide Woelm d'activité III pour la purification des ubiquinones. Pour les chromatographies sur couche mince, l'adsorbant le plus utilisé est le gel de silice G (Merck) et la poudre de cellulose MN 300, Macherey Nagel

B.- TECHNIQUES

1) Cultures

La composition d'un litre de milieu de culture est la suivante : glucose 25 g; KH_2PO_4 1,5 g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,5 g NH_4NO_3 1,5 g ; $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 1,5 g ; L-leucine 0,5 g ; L-asparagine 0,5 g ; vitamine B_1 0,25 mg. Un gramme d'extrait de levure par litre de milieu est ajouté lors des cultures réalisées en anaérobiose. L'inhibiteur est introduit stérilement dans le milieu de culture généralement au moment de l'ensemencement, à la concentration de $1,2 \cdot 10^{-4} \text{M}$ pour la benzophénone, de 10^{-4}M pour le 4-acétylbiphényle et $5,5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ pour la 9-fluorénone. Des fioles de 100 ml contenant 20 ml de milieu sont ensemencées à partir d'un fragment de mycélium provenant d'une culture sur milieu gélosé à base de maltéa, et servent à inoculer les cultures. Celles-ci sont effectuées soit en ballon à température ordinaire, soit en incubateur Biolafitte de 20 l. à 25°C , l'aération étant assurée dans les deux cas par un barbotage d'air stérile. Leur illumination est réalisée de façon discontinue et variable (lumière du jour) ou de façon continue et plus intense (lampe Philips Attralux spot de 150 W).

L'anaérobiose est réalisée par un bulle à bulle soit d'azote ($\text{N}_2 \gg 99,89\%$) de CO_2 ($\text{CO}_2 \gg 99,99\%$) d'éthylène ($\text{C}_2\text{H}_4 \gg 99,89\%$) ou d'hydrogène ($\text{H}_2 \gg 99,5\%$).

2) Extraction et identification des métabolites isolés de milieux de culture.

Après 5 ou 6 jours de culture, le milieu est séparé de la masse mycélienne par filtration sur verre fritté puis épuisé plusieurs fois à l'éther sulfurique et à l'acétate d'éthyle après acidification à pH 2 par HCl dilué. Les extraits sont rassemblés et séchés sur Na_2SO_4 anhydre puis évaporés à sec.

Une partie aliquote de l'extrait est chromatographiée sur couche mince de Kieselgel G avec soit du benzène seul, soit du benzène contenant 5% de méthanol comme solvant de migration. Le chromatogramme est révélé dans le cas des phénols par pulvérisation d'une solution aqueuse de chlorure ferrique à 5% puis d'une solution de ferricyanure de potassium à 5%. Les cétones sont mises en évidence par pulvérisation de dinitrophénylhydrazine en solution à 0,1% dans HCl 2N.

L'isolement des différents composants de l'extrait brut se fait par chromatographie préparative sur couche de gel de silice G de 0,5 mm d'épaisseur. Après élution des différentes fractions soit par de l'E.S, soit par du méthanol, celles-ci sont identifiées, après cristallisation, par leur point de fusion et par différentes techniques spectroscopiques (voir paragraphe 9).

Pour le glucoside, la configuration de la liaison osidique a été déterminée à l'aide de l' α -glucosidase (Sigma) à pH 6,8 et de la β -glucosidase (Sigma) à pH 5,2. L'activité de ces enzymes a été préalablement testée, respectivement avec le p-nitrophényl- α -D-glucopyranoside et la salicine. L'hydrolyse enzymatique du glucoside a été suivie en dosant par colorimétrie la quantité d'aglycone libérée.

3) Extraction, séparation et dosage des caroténoïdes

Le mycélium est broyé pendant 3 minutes dans un appareil MSK Braun (Melsungen R.F.A) à une température voisine de 0°C. La masse cellulaire est alors traitée plusieurs fois à l'acétone qui, après addition d'eau, est épuisée à plusieurs reprises par de l'éther de pétrole et de l'éther sulfurique. Les extraits sont concentrés puis saponifiés sous azote, à + 5°C, à l'obscurité, pendant 12 heures par de la potasse alcoolique à 10%. La solution étherée contenant les pigments est ensuite soigneusement lavée jusqu'à neutralité, séchée sur sulfate de sodium anhydre et chromatographiée sur colonne d'alumine Merck d'activité I. Des quantités variables d'E.S dans E.P permettent d'éluer successivement les différents caroténoïdes. Les dosages sont effectués par spectrophotométrie en utilisant les coefficients d'absorption mentionnés dans le tableau suivant.

TABEAU 1

Caractères spectroscopiques des caroténoïdes en solution dans l'éther de pétrole

Caroténoïdes	Valeurs en nm des maxima d'absorption	E 1 % 1 cm	Référence
phytoène	275 - <u>285</u> - 296	850	31
phytofluène	332 - <u>348</u> - 368	1540	32
ζ -carotène	378 - <u>399</u> - 424	2500	33
neurosporène	415 - <u>439</u> - 469	2990	34
lycopène	446 - <u>474</u> - 506	3450	35
β -zeacarotène	406 - <u>430</u> - 456	2520	36
γ - carotène	435 - <u>461</u> - 494	3100	35
β - carotène	428 - <u>453</u> - 482	2592	35

Lors de la chromatographie des caroténoïdes, les stérols contenus dans l'insaponifiable et fortement retenus sur colonne d'alumine d'activité I sont élués à la suite du lycopène. Le dosage des stérols Δ^{5-7} et en particulier de l'ergostérol se fait par spectrophotométrie à 281 nm dans l'éther, le coefficient d'absorption $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ étant de 287 (37).

4) Extraction et analyse des lipides

Après broyage, la masse cellulaire est traitée plusieurs fois selon la technique de FOLCH par un mélange chloroforme-méthanol (2 - 1). Les extraits sont rassemblés, lavés par une solution de NaCl à 7,5 % et concentrés à sec.

Une chromatographie préparative des lipides totaux sur plaque de gel de silice G (0,5 mm) permet de séparer les différents groupes de lipides. Les chromatogrammes sont développés dans le système éther de pétrole-éther sulfurique-acide acétique (90-10-1, v/v) et révélés par pulvérisation de rhodamine G ou par le mélange acide chromique-acide sulfurique (1-1, v/v). Les stérides et les stérols libres sont dosés selon la technique de LIEBERMANN. Le dosage des esters d'acides gras s'effectue par colorimétrie des hydroxamates ferriques (38). Le phosphore des phospholipides totaux est dosé par colorimétrie après minéralisation de l'échantillon (39). La séparation des différents groupes de phospholipides est réalisée par chromatographie sur plaque de gel de silice G dans le système chloroforme-méthanol-eau (65-25-4, v/v). Le réactif de DRAGGENDORF permet de révéler les lipides contenant de la choline, le réactif à la ninhydrine les aminophosphatides et le réactif au nitrate d'argent ammoniacal, l'inositol et le glycérol.

Les acides gras sont obtenus après saponification des lipides totaux à reflux pendant 2 heures par de la potasse alcoolique à 5%. Après élimination de l'insaponifiable,

la phase aqueuse est acidifiée par HCl dilué et les acides gras sont extraits par de l'éther. Après méthylation par le diazométhane ils sont analysés par chromatographie en phase gazeuse (Aerograph 660 à ionisation de flamme) sur colonne de DEGS (15% sur chromosorb W 18/100 de 5' de long et 1/8" de diamètre) à 185°C et sur colonne de SE 30 (5% sur chromosorb W 60/80 de 5' de long et 1/8" de diamètre) à 180°C. L'identification est obtenue par comparaison des temps de rétention avec ceux d'acides gras témoins, le dosage étant effectué à partir de la surface des pics.

5) Extraction et dosage des ubiquinones

Le mycélium est mis à macérer avec du méthanol puis après agitation vigoureuse pendant 1 mn, est saponifié au baign-marie à 80°C pendant 30 mn par de la potasse aqueuse à 100% additionnée d'un égal volume de pyrogallol à 20% dans du méthanol (40). Après extraction par de l'éther de pétrole et chromatographie sur colonne d'alumine acide d'activité III, les ubiquinones sont récupérées dans la fraction éluée avec 5% d'éther sulfurique dans l'éther de pétrole. Elles sont ensuite dosées en solution dans l'alcool avant et après réduction par le borohydrure de sodium de la forme quinone en quinol. La quantité de quinone (supposée être UQ 9 pure), est calculée en mesurant la diminution d'absorption à 275 nm avec

$$E_{1\%}^{1\text{ cm}} = 154 \text{ d'après HEMMING (41)}.$$

6) Extraction et dosage des flavines

A une suspension de mycélium dans l'eau on ajoute un volume d'acide trichloracétique à 50% et le mélange est agité à l'aide d'un homogénéiseur pendant 1 mn. Après 5 mn de contact une centrifugation à 9000 g permet d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est déposé immédiatement sur une colonne de Florisil 60/100 mesh préalablement lavée par de l'acide trichloracétique à 2%, de l'eau puis de la pyridine à 0,5%. Les flavines

sont éluées avec 25% de pyridine dans l'eau (42). Toutes ces manipulations s'effectuent au froid et à l'obscurité. Les flavines sont dosées par fluorimétrie et par rapport à un étalon de riboflavine avant et après réduction du FAD en FMN par l'hydrosulfite de sodium (43). Pour une étude qualitative, les flavines sont séparées sur couche mince de cellulose dans un système isobutanol-acide acétique-eau (4-3-3, v/v) qui donne une bonne séparation du FAD, FMN et de la riboflavine (44).

7) Isolement des globules lipidiques

Le mycélium est broyé pendant 2 mn dans un tampon Sörensen pH 7,2 contenant du saccharose 0,5 M, à l'aide du broyeur MSK (Braun, Melsungen R.F.A). Une centrifugation à 1500 g pendant 10 mn permet d'éliminer les gros débris cellulaires et à 8000 g pendant 15 mn, les mitochondries. A une vitesse maximum (176000 g; centrifugeuse Beckman Spinco L 50, rotor 50-I) une couche huileuse formée de globules de taille variable surnage. Cette couche huileuse est remise en suspension dans du tampon Sörensen puis purifiée par 2 autres centrifugations à la même vitesse.

Après traitement des globules par le mélange chloroforme-méthanol (2-1, v/v) les lipides et acides gras sont étudiés à l'aide des techniques décrites précédemment. Les protéines récupérées par centrifugation sont dosées selon la méthode de LOWRY (45) par rapport à un étalon de sérum albumine. L'étude de leur composition en acides aminés est réalisée, après hydrolyse par HCl 6N en tube scellé pendant 4 heures à 100°C, avec un Autoanalyseur Technicon.

8) Techniques spectroscopiques

Les spectres ultraviolets ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Beckman DK 2S et les spectres infrarouges sur un spectrophotomètre Perkin Elmer 337.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton ont été obtenus avec les spectromètres Brucker HFX 90 MHz et Thomson Houston 250 MHz avec balayage de champ; les échantillons étant dissous dans du deutérochloroforme contenant du tétraméthysilane comme référence interne.

Les spectres de RMN du carbone 13 ont été effectués à l'aide de l'appareil Brucker 22, 63 Hz avec transformation de Fourier et accumulation.

9) Microscopie électronique

Les cellules sont fixées soit au permanganate à 2% soit à l'acide osmique à 2% dans un tampon phosphate de pH 7 pendant 2 heures. Après plusieurs lavages, les cellules sont déshydratées dans une série de bains de concentrations croissantes en éthanol. Les globules lipidiques fixés à l'acide osmique sont inclus dans la gélose avant d'être déshydratés. L'inclusion des différents échantillons est réalisée dans l'Epon 812. Les coupes obtenues à l'aide d'un microtome Reichert sont contrastées au citrate de plomb et observées au microscope Siemens Elmiskop 101 ou 1 A.

CHAPITRE I

ETUDE DE LA CONFIGURATION DES CAROTENOIDES DE MUCOR HIEMALIS



Si le phytoène et le phytofluène provenant de l'huile de carotte sont essentiellement de configuration 15-cis, les caroténoïdes naturels présentent d'une façon très générale une configuration all-trans (46).

Toutefois des isomères mono-cis et même poly-cis du neurosporène et du lycopène, souvent dénommés proneurosporène et prolycopène, ont été isolés chez quelques végétaux et en particulier chez certaines variétés de tomates et baies de Pyracantha angustifolia (47). Ces caroténoïdes poly-cis n'existent cependant qu'à l'état de traces et ne peuvent pas être transformés in vitro en isomères all-trans. De plus aucune preuve ne démontre leur rôle de précurseurs normaux dans la biosynthèse des caroténoïdes all-trans.

Un cas particulier qui mérite d'être signalé, est celui de mutants de Chlorelle qui cultivés à l'obscurité produisent du proneurosporène et du prolycopène qui se transforment en isomères trans dès que l'on soumet ces cultures à une illumination, à la suite d'une réaction photochimique plutôt que d'une réaction enzymatique (48).

Les champignons sont réputés ne synthétiser que les isomères trans des caroténoïdes mais il ne s'agit nullement d'une règle générale et Fusarium aquaeductum synthétise du lycopène poly-cis lorsqu'il est cultivé à la lumière et soumis à une aération intense (49). De plus, des isomères cis du β , γ et α - carotène ont été signalés chez Penicillium sclerotiorum (50). Il est difficile de savoir si ces isomères représentent des produits naturels ou des artéfacts produits par stéréomutation au cours de l'isolement.

La caroténogénèse de M.hiemalis se caractérise par une accumulation importante de β -carotène (61,4 %) et par une synthèse relativement élevée de phytoène (32,1%). Les autres pigments sont présents en quantité beaucoup plus faible :

phytofluène 1,7 %, β -zeacarotène 0,8 %, ζ -carotène 1,2 %, γ -carotène 1,0 %, neurosporène 0,9 %, lycopène 0,7 %.

Aucune modification du comportement chromatographique ni déplacement des maxima d'absorption ni apparition d'un " cis peak " n'ayant été observés pour les pigments colorés de M.hiemaleis, nous leur avons attribué une configuration all-trans.

A.- STEREOCHIMIE DU PHYTOÈNE

Le phytoène naturel possède au centre de sa molécule un système triénique dont la double liaison entre les atomes de carbone 15,15' est de configuration cis. Celle des doubles liaisons entre les atomes 13,14 ou 13',14' n'est supposée trans que d'après des fondements biogénétiques (46).

Du fait de la teneur assez faible des cultures normales en phytoène, l'étude de sa configuration sera abordée dans un premier temps à partir de cultures réalisées en présence d'inhibiteurs de la caroténogenèse, qui entraînent une accumulation conséquente de phytoène (51).

Les cultures sont effectuées en présence de benzophénone ou de 9-fluorénone dans des ballons de 20 litres éclairés en continu pendant 5 jours. La fraction contenant l'insaponifiable est chromatographiée sur colonne d'alumine neutre d'activité I. Le phytoène est élué par de l'éther de pétrole contenant 2% d'E.S puis chromatographié à nouveau sur alumine alcaline Woelm d'activité I. Les éluats recueillis par fraction de 25 ml sont examinés en ultraviolet. On constate ainsi qu'un premier isomère (I) s'élué avec 3% d'E.S dans E.P et un second isomère (II) avec 5%.

Dans les cas où la quantité de phytoène est élevée, ce qui a lieu particulièrement lorsque les cultures sont effectuées en présence de 9-fluorénone, un troisième isomère (III), peu abondant, s'élué immédiatement après le premier.

Avant d'étudier la configuration de ces isomères, nous nous sommes naturellement assurés que la stéréoisomérisation ne provenait pas de manipulations comme la chromatographie, la saponification ou l'action éventuelle de la lumière durant les manipulations.

1) Spectres ultraviolets

Ces isomères ont des maxima d'absorption à des longueurs d'onde identiques (275, 285 et 296 nm) mais se différencient par la présence, dans le cas de l'isomère (I), d'une inflexion à 296 nm qui fait place dans le cas de l'isomère (III) à un véritable pic dont l'intensité augmente dans le cas de l'isomère (II).

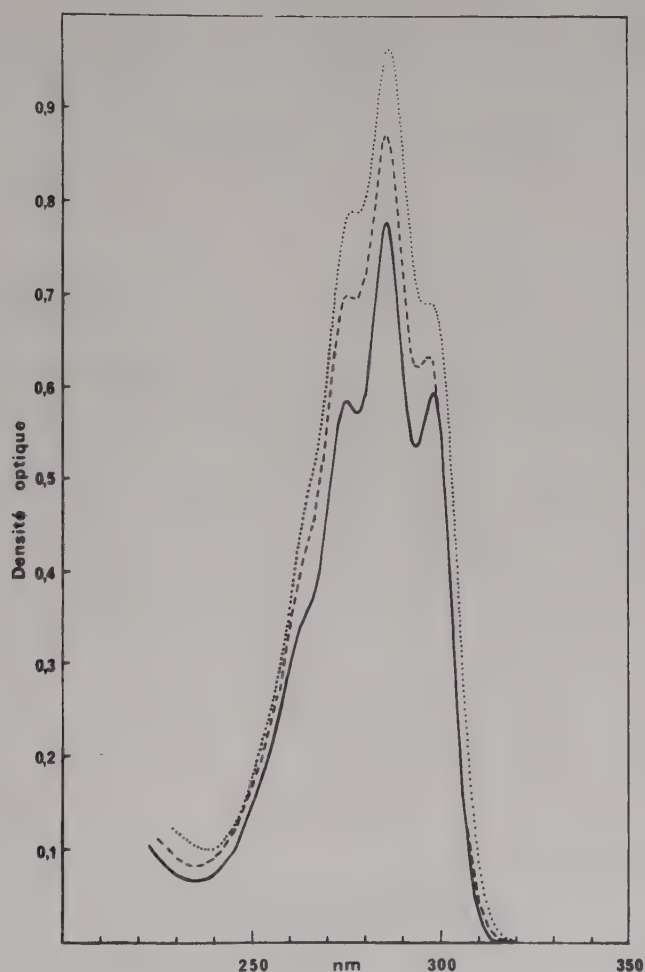


Figure 1 : Spectres ultraviolets des différents isomères du phytoène (..... I, — II, --- III).

Le spectre ultraviolet de l'isomère (III) pourrait laisser supposer qu'il s'agit en fait d'un mélange des isomères (I) et (II). Cependant plusieurs chromatographies successives ne permettent pas de le séparer en isomères (I) ou (II).

2) Isomérisation

Une solution éthéropétrolique de l'isomère (I) exposée devant une source de lumière ultraviolette (Mineralight , modèle SL 2537) en présence d'une quantité catalytique d'iode, nous conduit aux mêmes résultats que ceux décrits par JUNGALWALA (52) pour l'isomérisation du phytoène naturel cis. Nous avons pu évaluer la quantité de l'isomère (II) ainsi formée à 25% de l'isomère (I) initial. Ce comportement laisse penser que l'isomère (I) possède une configuration cis et l'isomère (II) une configuration trans en ce qui concerne la double liaison située au centre de la molécule de phytoène.

3) Spectres de masse

Les trois isomères du phytoène présentent le même mode de fragmentation déjà décrit par d'autres auteurs (53). Ainsi on note un ion moléculaire à m/e 544 ainsi que la perte d'ions fragments M-69, M-137, M-205 correspondant respectivement à m/e 475, m/e 407 et m/e 339. Ceci montre que le système triénique est bien situé dans les trois isomères au centre de la molécule.

4) Spectres infrarouges

Ils apportent des données complémentaires à celles obtenues à partir des spectres ultraviolets. En effet, l'isomère (I) présente une bande à 765 cm^{-1} caractéristique d'une double liaison cis disubstituée ne portant aucun groupement méthyle. L'isomère (II) ne montre aucune absorption notable à 765 cm^{-1} mais possède en revanche une bande importante à

960 cm^{-1} qui peut être attribuée aux vibrations hors du plan des hydrogènes portés par une double liaison trans disubstituée (54). Ces résultats sont par ailleurs en accord avec les travaux publiés par DAVIS (46).

Quant à la fraction (III), une bande importante à 765 cm^{-1} ainsi qu'une bande d'intensité plus faible à 955 cm^{-1} révèlent la présence d'un mélange d'isomères, cependant différents des isomères (I) et (II) d'après les caractères chromatographiques.

5) Spectres de résonance magnétique nucléaire du proton

Si les spectres de RMN obtenus à 90 MHz montrent des différences très nettes dans la région correspondant aux protons du triène central, les spectres obtenus à 250 MHz permettent une analyse plus détaillée de cette région (55).

a - Pour l'isomère cis, les déplacements chimiques $\delta = 1,62\text{ ppm}$ et $\delta = 1,68\text{ ppm}$ correspondent aux groupes méthyle terminaux, tandis que ceux à $\delta = 1,60\text{ ppm}$ et $\delta = 1,76\text{ ppm}$ sont attribués aux groupes méthyle situés sur les doubles liaisons isolées et à ceux situés sur les atomes de carbone 13 et 13'. Les protons des groupes méthylène sont déplacés à $\delta = 2,07\text{ ppm}$ et les protons situés sur les doubles liaisons isolées à $\delta = 5,09\text{ ppm}$. Les 4 protons du triène central ont les déplacements chimiques suivants : $\delta_{14,14'} = 6,30\text{ ppm}$, $\delta_{15,15'} = 6,09\text{ ppm}$. La constante de couplage J correspondant aux protons des atomes de carbone 15 et 15' a pour valeur 11,3 Hz, ce qui caractérise une configuration cis pour la double liaison centrale.

b - Dans le cas de l'isomère trans, les déplacements chimiques relatifs aux protons portés par les atomes de carbone 15,15' et 14,14' ont pour valeur respective 6,32 ppm et 5,88 ppm. La valeur de la constante de couplage $J_{H\ 15,15'}$ est égale à 15 Hz, ce qui confirme la configuration trans de la double liaison centrale. Comme dans le cas des isomères cis et trans du β -carotène

nous observons une inversion des déplacements chimiques pour les protons portés par les atomes de carbone 14,14' et 15,15' lorsqu'on passe de l'isomère cis à l'isomère trans (56).

Nous observons de plus un dédoublement des signaux à $\delta = 1,76$ et $1,83$ ppm provenant des protons méthyliques portés par les atomes de carbone 13 et 13'. Si la molécule était symétrique, on aurait un seul signal comme dans le cas de l'isomère cis, c'est la raison pour laquelle les signaux à $1,76$ et $1,83$ ppm peuvent être attribués aux groupes méthyle respectivement en position cis et trans sur les doubles liaisons en 13 et 13'. Le spectre obtenu correspond bien à celui d'un mélange de phytoène-all-trans contaminé par de très faibles quantités de phytoène dont le système triénique central présente la configuration cis, trans, trans.

c - Dans le cas du mélange d'isomères correspondant à la fraction (III), la région du triène central montre que le mélange consiste essentiellement en isomères cis sur la double liaison centrale. La région correspondant aux groupes méthyle portés par les atomes de carbone 13 et 13', comporte trois signaux différents : celui à $\delta = 1,76$ ppm est attribué aux protons méthyliques du C_{13} en position cis (phytoène-all-trans, phytoène-15-cis) tandis que ceux à $\delta = 1,78$ et $1,83$ ppm correspondent aux protons méthyliques du C_{13} en position trans (phytoène " cis, trans, trans " et phytoène " cis, cis, trans ").

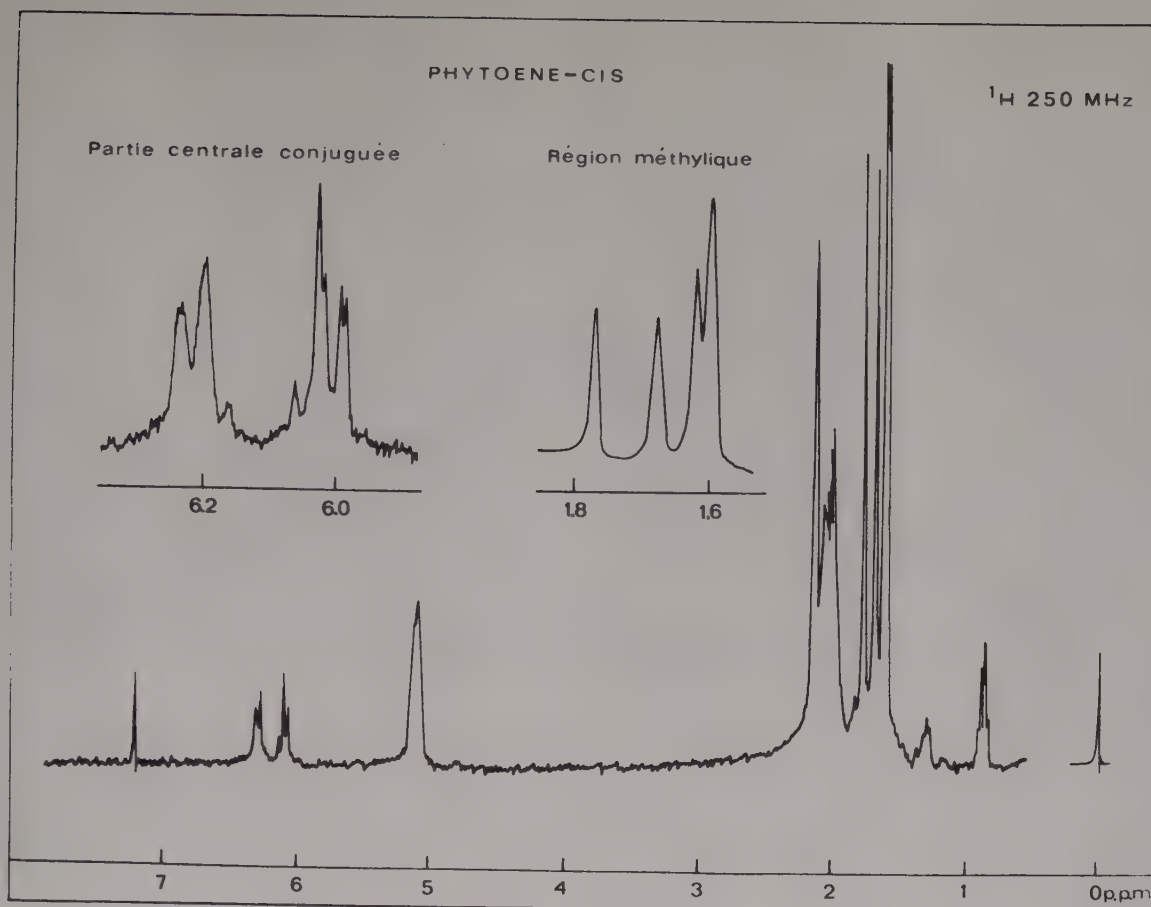


Figure 2 : Spectre de RMN du proton du phytoène-cis à 250 MHz.

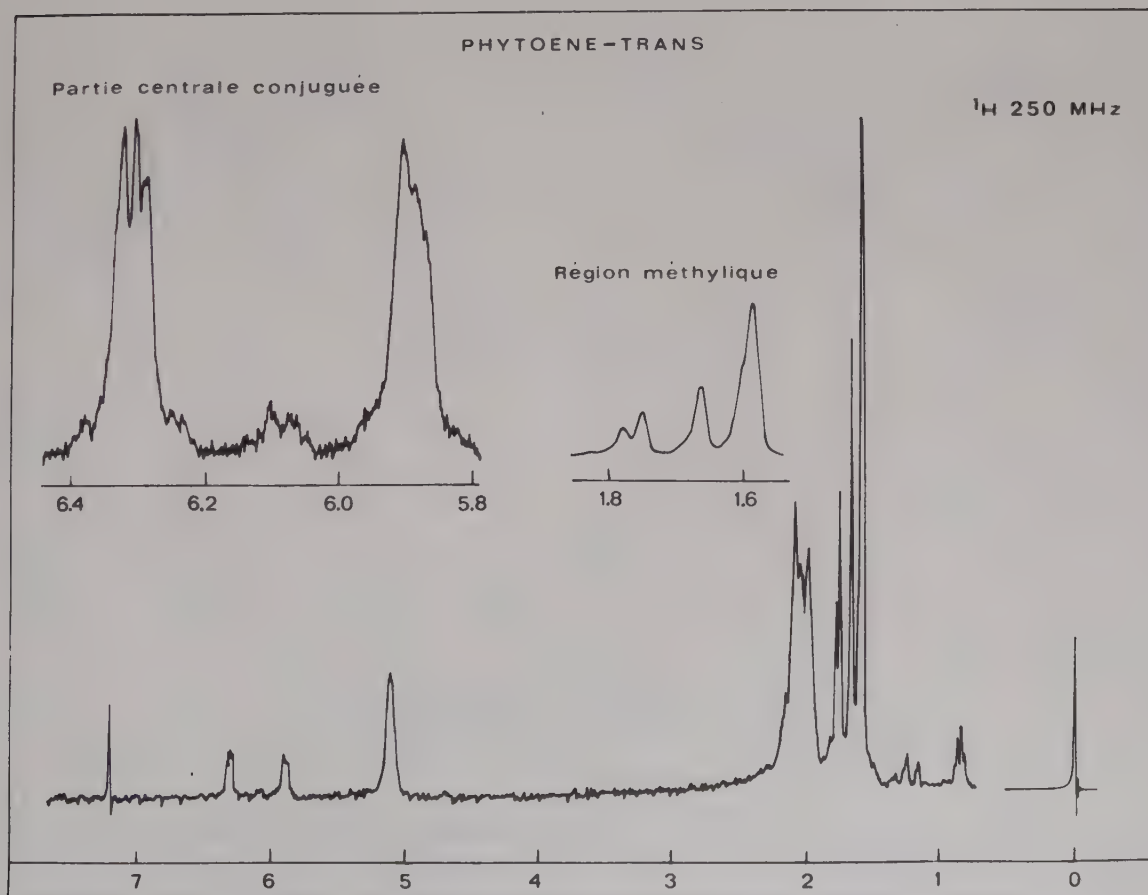
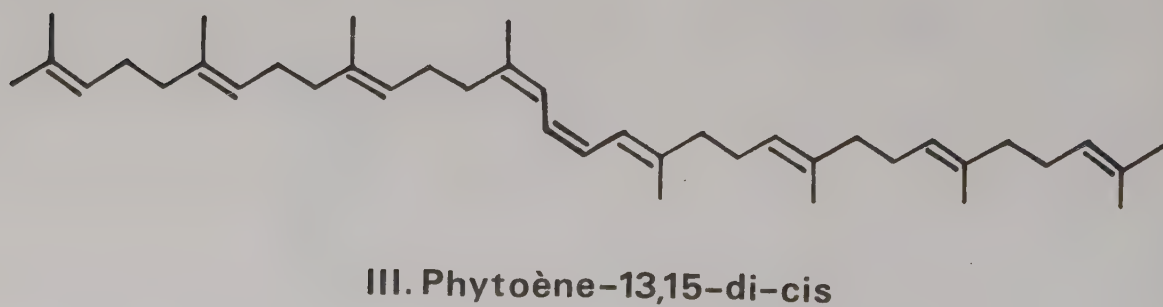
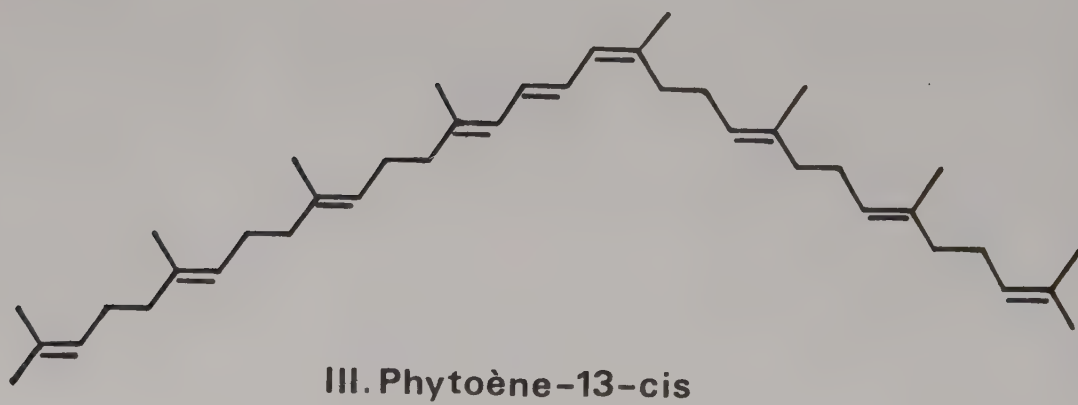
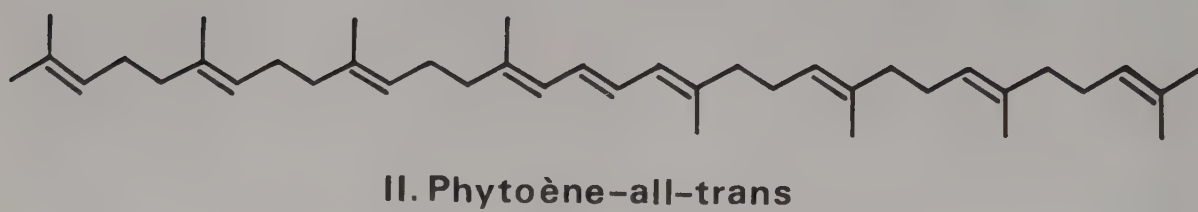
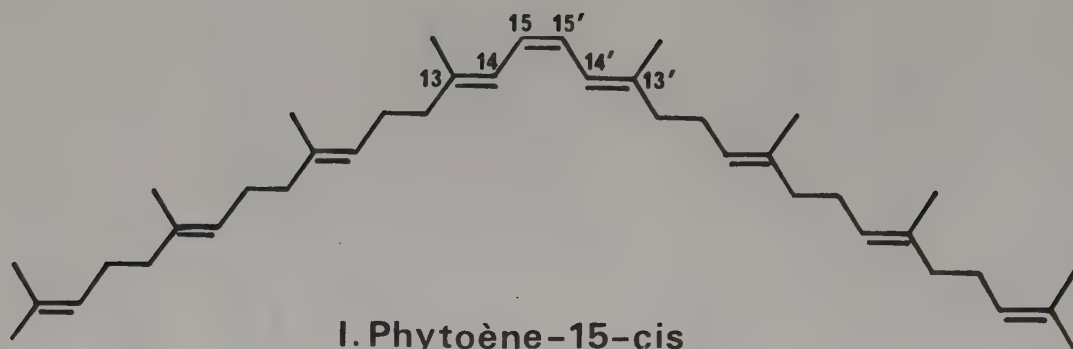


Figure 3 : Spectre de RMN du proton du phytoène-trans à 250 MHz.



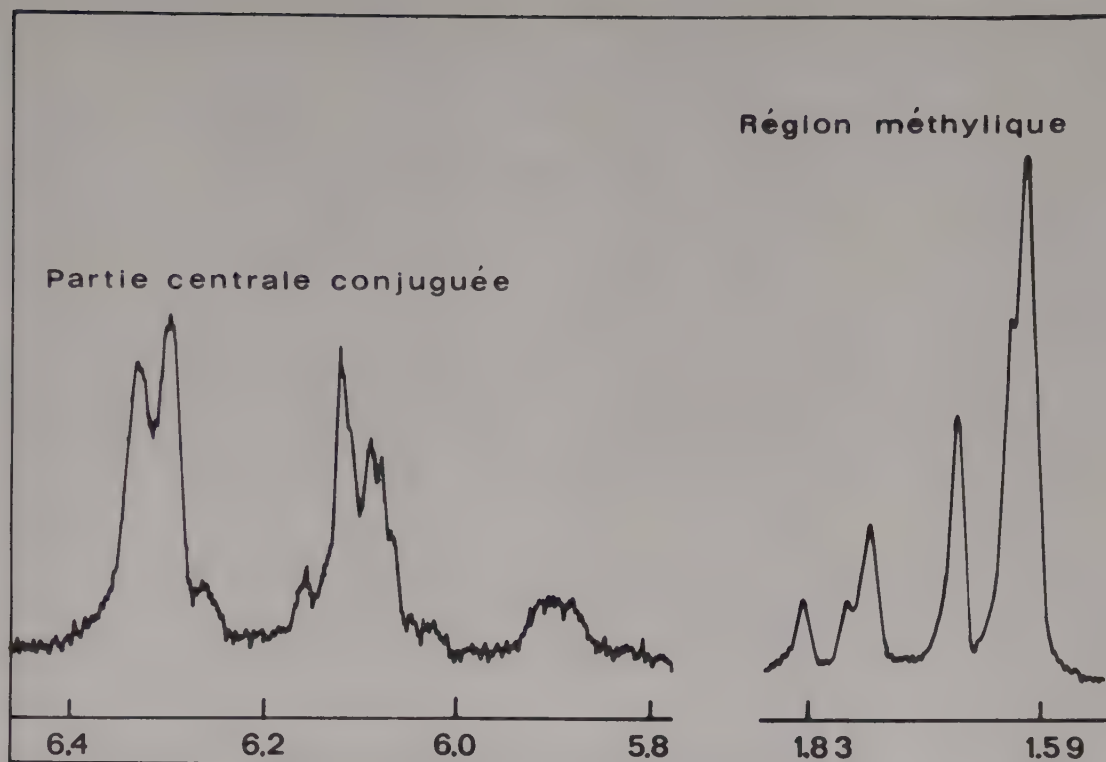


Figure 4: Spectre de RMN du proton à 250 MHz de la fraction III.

Ces résultats concernant le système triénique central des isomères du phytoène viennent d'être récemment confirmés à l'aide de modèles synthétiques (57). Ainsi un groupe méthyle fixé sur une double liaison de configuration trans à l'extrémité d'un système triénique conjugué donne un signal indépendant de la stéréochimie du reste de la molécule. Mais un méthyle situé sur la double liaison cis terminale donne un signal déplacé de 0,02 à 0,04 ppm si la double liaison conjuguée la plus proche est de configuration trans et de 0,07 à 0,08 ppm si elle est de configuration cis.

6) Spectre de résonance magnétique nucléaire du ^{13}C .

L'attribution des différents signaux obtenus est faite par comparaison avec les déplacements chimiques obtenus à partir de composés polyisopréniques voisins tels que les isomères cis et all-trans du β -carotène en ce qui concerne les protons du triène central (58) et tels que le squalène pour les protons portés par les chaînes latérales.

Le tableau 2 rassemble les résultats obtenus à partir des spectres de RMN du ^{13}C des différents isomères du phytoène

TABEAU 2

Déplacements chimiques en ppm des atomes de carbone (^{13}C) des isomères du phytoène

Carbone	Phytoène-15-cis	Phytoène-all-trans	Phytoène-13-cis
1	131,37	131,37	131,37
2	124,22	124,22	124,22
3	27,00	26,87	26,87
4	39,93	39,93	39,93
5	135,14	135,14	135,14
6	124,48	124,48	124,48
7	27,00	26,87	26,87
8	39,93	39,93	39,93
9	135,53	135,46	135,46
10	124,68	124,68	125,07
11	27,00	26,87	26,77
12	40,71	40,71	32,85
13	123,64	127,34	127,47
14	120,52	125,72	126,50
15	139,62	138,26	138,52
Me 1 cis	17,84	17,84	17,84
Me 1 trans	25,83	25,83	25,83
Me 5	16,21	16,21	16,21
Me 9			
Me 13	16,73	16,93	24,14

Dans le cas des isomères cis et trans du phytoène toutes les doubles liaisons isolées ont la configuration trans et les déplacements chimiques des atomes de carbone du triène central sont voisins de ceux observés pour les isomères correspondants du β -carotène.

Le mélange d'isomères (III) présente des différences avec l'isomère all-trans uniquement en ce qui concerne la région du triène central. Celles-ci proviennent vraisemblablement de la configuration cis des doubles liaisons en 13 et 13'.

Si la séparation chromatographique du phytoène-15-cis et du phytoène-all-trans s'avère satisfaisante, la séparation des différents isomères (I), (II) et (III) du phytoène obtenus en présence de 9-fluorénone est beaucoup plus délicate. Néanmoins, la stéréochimie des isomères du phytoène naturel a pu être établie sans ambiguïté grâce en particulier à la technique de RMN à fréquence élevée.

Nous avons ensuite cherché à établir la stéréochimie du phytoène isolé des cultures normales, bien que les quantités synthétisées soient très inférieures à celles des cultures inhibées.

A côté de l'isomère 15-cis qui constitue de loin le composé majeur, nous avons pu mettre en évidence un autre isomère qui ne représente guère plus de 2% par rapport à la quantité totale de phytoène. Cet isomère présente les mêmes caractères chromatographiques et le même spectre ultraviolet que le phytoène-all-trans issu des cultures inhibées. Cependant la quantité dont nous disposons, ne nous a pas permis de l'étudier de façon plus approfondie. Mais nous pouvons supposer dès à présent, que le phytoène-all-trans naturel peut avoir une origine différente de celle de la majorité du phytoène-all-trans issu des cultures inhibées où nous ne pouvons pas exclure une intervention des inhibiteurs de la caroténogénèse dans l'isomérisation photochimique du phytoène-15-cis naturel.

Quelque temps après l'élucidation de ces structures, du phytoène-all-trans a été obtenu chez différents microorganismes cultivés en présence (60, 61) ou en absence (62, 63) d'inhibiteurs de la caroténogénèse.

B.- CONFIGURATION DU PHYTOFLUÈNE

Le phytofluène s'élue avec 5% d'E.S dans E.P sur alumine neutre d'activité I et avec 50% d'E.S dans E.P sur alumine Woelm d'activité I. Son spectre montre des maxima d'absorption à 368, 348 et 331 nm et le rapport des intensités d'absorption mesurées à 348 et 368 est égal à 1,04, valeur qui correspond d'après KOE et ZECHMEISTER au phytofluène-all-trans (64). Il faut souligner que nous n'avons pas réussi à mettre en évidence d'isomères cis du phytofluène chez M.hiemaleis, ce qui ne signifie cependant pas que le champignon soit incapable d'en effectuer la synthèse.

La désaturation du phytoène par un extrait enzymatique issu de plastides de tomates, conduit au phytofluène-cis et avec un rendement moindre au phytofluène-trans (65). La présence exclusive de phytofluène-trans chez M.hiemaleis peut être considérée comme un argument en faveur de la filiation phytoène-trans, phytofluène-trans.

CHAPITRE II

INHIBITEURS DE LA CAROTENOGENESE



A la suite des travaux de TURIAN (66) la diphénylamine a été la première substance chimique connue, et la plus largement utilisée, pour inhiber la caroténogenèse (67). Certains dérivés du biphényle possèdent également la même propriété vis-à-vis de différents microorganismes et notamment de levures du genre Rhodotorula (68). Ainsi, la benzophénone, l'acridine et ses dérivés possèdent des propriétés anticaroténogènes vis-à-vis d'une souche de Mycobacterium (69). A partir de ces résultats, RILLING (69) a proposé, d'après des considérations d'isostérie, une hypothèse basée sur une compétition entre ces différentes substances inhibitrices et le phytoène pour l'occupation du site actif de l'enzyme intervenant dans la désaturation de ce polyène.

A la suite de travaux antérieurs du laboratoire (68), nous nous sommes attachés, dans un premier temps, à sélectionner de nouvelles substances anticaroténogènes (70). Ceci nous a permis, d'une part de bloquer la synthèse des pigments au niveau des précurseurs incolores des caroténoïdes, d'autre part de tenter d'élucider le mécanisme régissant l'inhibition de la caroténogenèse.

A.- RECHERCHE D'INHIBITEURS DE LA CAROTENOGENESE

Nous avons tout d'abord étudié les substances qui dérivent, au point de vue structural, de façon plus ou moins étroite, du 2-hydroxybiphényle et de la diphénylamine.

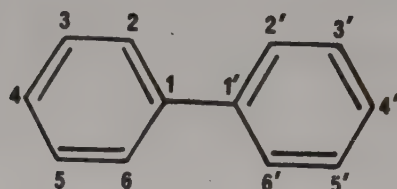
1) Dérivés du biphényle

Contrairement à ce qui a été observé chez Rhodotorula mucilaginosa (68), ni le biphényle, ni le 2-hydroxybiphényle n'exercent d'action marquée sur la pigmentation de Mucor hiemalis.

Le tableau 3 regroupe quelques-uns des résultats obtenus avec différents dérivés du biphenyle en fonction du nom et de la nature des substituants.

TABLEAU 3

Action de différents dérivés du biphenyle sur la caroténogenèse de Mucor hiemalis



Substituant	Position					
	2	2,2'	3	3,3'	4	4,4'
OH	-	-			x	-
CH ₃	±	±	±	±	+	
OCH ₃	±			+	+	
CO-CH ₃					+	
COOH		-			x	
NH ₂	-				-	-
NO ₂	-	-			-	-
F	-	-				-
Br						-

- dérivés inactifs sur la caroténogenèse
- + dérivés inhibant totalement la caroténogenèse
- ± dérivés inhibant partiellement la caroténogenèse
- x dérivés inhibant la croissance

De l'examen de ce tableau, il ressort que les dérivés aminés, nitrés ou halogénés n'ont aucun effet sur la pigmentation. Ceux qui possèdent des groupements, méthyle, méthoxyle ou acétyle sont en revanche actifs et c'est sans conteste le 4-acétyl-biphényle qui est le plus efficace. Quant aux dérivés carboxylés, ils perturbent surtout la croissance du champignon.

L'introduction d'un substituant supplémentaire mais de nature différente de celui préexistant ne modifie pas en général, les résultats ci-dessus. C'est ainsi que le 4-méthoxy-biphényle conserve son activité lorsqu'on introduit un atome de chlore en 3. Parfois, cependant une activité antagoniste se développe en particulier vis-à-vis de la croissance ce qui rend difficile les interprétations. En revanche, on constate que les dérivés qui ont des substituants de même nature comme le 2,2', 4,4'-tétrahydroxybiphényle, le 2,2'-dihydroxybiphényle, le 4,4'-dihydroxybiphényle et l'acide diphénique par exemple, sont sans action sur la caroténogenèse.

Il est par ailleurs intéressant de savoir si une modification du squelette du biphényle entraîne une diminution ou une augmentation de l'activité anticaroténogène. Pour cela nous avons testé l'action du dicyclohexyle, du p-cyclohexylphénol, de l'o-cyclohexylphénol et du 1-phényl-1-cyclohexanol. Tous ces composés se sont révélés inactifs vis-à-vis de la caroténogenèse de Mucor hiemalis.

2) Composés à deux noyaux benzéniques séparés par un groupe d'atomes (R)

La diphénylamine étant le plus ancien composé utilisé comme inhibiteur de la caroténogenèse, nous l'avons donc étudié en premier ainsi que certains de ses dérivés.

a) Diphénylamine et dérivés (R = NH)

Si la diphénylamine se révèle être active sur la pigmentation de Mucor hiemalis, ses dérivés aminés, comme ceux du biphenyle, n'exercent aucune action sur la caroténogenèse. Parmi les dérivés hydroxylés, seule la 4-hydroxydiphénylamine inhibe la pigmentation avec une efficacité comparable à celle de la diphénylamine elle-même.

La N-méthyldiphénylamine (R = N-CH₃) est également sans action tandis que la 2-carboxydiphénylamine inhibe totalement la croissance du champignon même pour des doses de l'ordre de 2.10⁻⁵M.

Le dérivé hydrogéné sur l'un des noyaux de la diphénylamine (N-phénylcyclohexylamine) ne possède qu'une très faible action inhibitrice et la dicyclohexylamine n'a rigoureusement aucun effet aussi bien sur la croissance que sur la caroténogenèse.

b) Benzophénone et dérivés (R = C=O)

Déjà utilisée dans l'inhibition de la caroténogenèse chez les Mycobactéries (69), la benzophénone s'est révélée également très efficace chez Mucor hiemalis. Toute substitution introduite cependant sur l'un des noyaux entraîne une diminution et parfois une suppression de l'activité par rapport à la benzophénone. C'est ainsi que la 4-hydroxybenzophénone conserve encore un certain pouvoir d'inhiber la pigmentation mais la 2,4-dihydroxybenzophénone ainsi que la carboxy-2 et la carboxy-2,4-diméthylbenzophénone sont sans effet sur la caroténogenèse.

c) Autres dérivés

L'oxyde de phényle (R = -O-) et le diphénylméthane (R = CH₂) inhibent faiblement la pigmentation alors que le diphénylcarbinol (R = CHOH) ainsi que le 1,1-diphényléthanol (R = C^{CH₃}_{OH}) inhibent totalement la synthèse des pigments

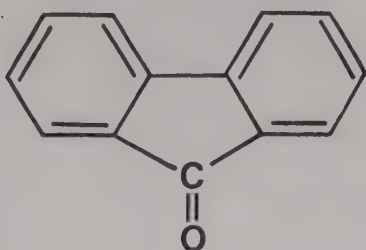
chez Mucor hiemalis . Le diphénylsulfure ($R = -S-$) et l'acide 3,3-diphénylpropionique ($R = CH-CH_2-COOH$) sont en revanche totalement dépourvus de toute activité.

3) Composés dont les deux noyaux benzéniques sont séparés par plus d'un groupe d'atomes.

Parmi les nombreuses substances testées, seul le stilbène-trans ($R = -CH=CH-$) s'est révélé actif, toutefois la suppression de la double liaison centrale (dibenzyle) entraîne la disparition totale de l'activité.

4) Composés à noyaux benzéniques condensés.

Le naphthalène, l'anthracène, le phénanthrène n'exercent qu'une faible action sur la caroténogenèse et leurs dérivés soit hydroxylés, soit méthoxylés ou aminés sont inactifs. En revanche, le fluorène provoque une inhibition très importante de la pigmentation mais ce sont sans conteste le 9-fluorénol et surtout la 9-fluorénone qui donnent les résultats les plus remarquables :



5) Composés à hétérocycles azotés.

L'inhibition par la pyridine et l'imidazole de la formation des caroténoïdes cycliques (71) nous a incités à étudier l'action de la nicotine.

Ce composé a déjà été signalé comme un inhibiteur assez spécifique de la cyclisation des caroténoïdes (72) et nos essais sur Mucor hiemalis tendent à confirmer ce résultat.

En effet, à la concentration de $6.10^{-3}M$ la nicotine provoque une accumulation notable de lycopène accompagné cependant de traces de γ -carotène. Ceci montre que l'inhibition de la cyclisation n'est pas totale ou bien que le mécanisme qui conduit normalement au β -carotène s'effectue selon un processus différent. Enfin, nous avons constaté que lorsque la nicotine est introduite sous forme de sulfate, aucune perturbation de la cyclisation n'a lieu. De plus, lorsque la concentration est voisine de $5.10^{-2}M$ il se produit une inhibition totale de la caroténogenèse.

6) Composés à un seul noyau benzénique

Bien que nous ayons choisi des composés présentant la plus grande diversité possible, soit par la nature des substituants (hydroxyle, carboxyle, amino ou nitro) soit par la position de ceux-ci sur le cycle, seuls le thymol, le carvacrol et l'alcool phényléthylique affectent la pigmentation de Mucor hiemalis. Cependant il faut signaler qu'à l'inverse des autres inhibiteurs étudiés ci-dessus, la concentration nécessaire pour obtenir une modification de la caroténogenèse, est beaucoup plus élevée et voisine de $2.10^{-1}M$.

B.- RELATION STRUCTURE-ACTIVITE DES INHIBITEURS DE LA CAROTENOGENESE.

Du fait de la diversité des structures des composés actifs apparentés ou non au biphenyle, bien des mécanismes peuvent être envisagés, mais le premier point à élucider est la nature véritable de l'inhibiteur. En effet, on peut penser que certains de ces composés sont actifs tels qu'ils sont incorporés dans le milieu de culture au moment de l'ensemencement. On ne peut cependant exclure qu'ils soient transformés par le micro-organisme en produits inactifs ou au contraire en produits présentant une action spécifique sur la pigmentation. Ceci pourrait peut-être d'ailleurs expliquer que, pour un inhibiteur donné,

on constate parfois des différences considérables d'activité suivant les microorganismes étudiés. Ainsi par exemple, le biphényle qui bloque totalement la caroténogenèse de Rhodotorula mucilaginosa (68) est inactif sur celle de Phycomyces blakesleeianus (73) . De même, la benzophéronone inhibe la pigmentation de Mucor hiemalis mais, reste sans action sur celle de Rh.mucilaginosa (74).

1) Etude des métabolites de quelques inhibiteurs de la caroténogenèse.

a) 2-hydroxybiphényle

Comme le biphényle lui-même, le 2-hydroxybiphényle n'a aucune action sur la caroténogenèse de Mucor hiemalis . Cependant, alors que ce dernier est retrouvé inchangé dans les cultures de Rhodotorula, il ne peut plus être mis en évidence dans celles de Mucor hiemalis après 4 jours de culture. Dans ce cas, le traitement du milieu à l'éther sulfurique et à l'acétate d'éthyle fournit un extrait qui se révèle être un mélange de deux substances. Par chromatographie sur plaque de gel de silice G dans le système méthanol-benzène (5-95, v/v) on sépare en effet une substance A de $R_f = 0,24$ et une substance B de $R_f = 0$. Le produit A s'oxyde facilement à l'air en donnant une coloration bleu-noir rappelant celle d'une quinhydrone. L'acétylation réductrice fournit une substance dont le spectre de masse indique un pic parent à m/e 270. Les fragments à m/e 228 et m/e 186 correspondent aux ions $M-42$ et $M-42-42$ dus à la perte de 1 puis de 2 groupements acétoxy.

Le spectre de RMN du proton présente 2 singulets à $\delta = 1,98$ ppm et $\delta = 2,18$ ppm attribués aux deux radicaux acétoxy fixés sur le noyau alors que les signaux à $\delta = 7,02$ ppm et $\delta = 7,28$ ppm correspondent respectivement à 3 et 5 protons benzéniques.

Enfin, l'oxydation chromique fournit une quinone :
 $F = 113-114^{\circ}\text{C}$ (litt. 114°C pour la 2-phénylbenzoquinone).

Ces résultats montrent sans ambiguïté que la substance est identique au 2,5-dihydroxybiphényle .

Le produit B présente des maximums d'absorption situés aux mêmes longueurs d'onde que ceux correspondant au 2-hydroxybiphényle (242 et 280 nm) et seule l'intensité relative des différentes bandes semble modifiée. Par acétylation on obtient une substance dont le spectre de masse présente un pic moléculaire à m/e 500. On observe également un ion intense à m/e 331 suivi des ions à m/e 271 (331-60) et 211 (331-60-60) résultant de la perte d'une puis de deux molécules d'acide acétique ainsi que les ions à m/e 229 (271-42) et m/e 169 (211-42) formés probablement par l'élimination dans chaque cas d'une molécule de cétène. Ces résultats montrent que la molécule contient un hexoaldopyrannose tétraacétylé.

Le spectre de résonance magnétique nucléaire du proton montre 4 singulets à $\delta = 1,55$ ppm; $\delta = 1,95$ ppm, $\delta = 2,00$ ppm et $\delta = 2,08$ ppm qui peuvent être attribués à 4 groupes acétoxy. Il faut particulièrement souligner pour un de ces signaux un déplacement vers les champs forts (1,55 ppm), dû à un effet de blindage d'un substituant aromatique. On note la présence de 9 protons benzéniques à $\delta = 7,18$ et 7,3 ppm. Deux protons correspondant à un groupement $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-$ sont responsables des signaux à 4,18 et 4,25 ppm. Enfin deux massifs centrés à 3,8 et 5,1 ppm représentent respectivement 1 et 4 protons. Ce spectre correspond à celui d'un hexose acétylé engagé en position 1 dans une liaison osidique avec une molécule de 2-hydroxybiphényle (7

Après hydrolyse chlorhydrique en tube scellé et chromatographie sur papier, l'hexose a été identifié au glucose. Par ailleurs, l'hydrolyse enzymatique par la β -glucosidase a permis de montrer la configuration β de la liaison osidique.

Les essais de culture en présence de glucoside montrent que celui-ci est sans action sur la caroténogénèse de M.hiemaleis et qu'il représente vraisemblablement un produit de détoxication rapidement élaboré par le mycélium.

b) 4-acétylbiphényle

Ce composé qui inhibe la caroténogénèse à partir de la concentration de $2,6.10^{-5}M$, est de loin le composé le plus actif que nous ayons expérimenté jusqu'ici. Son action directe n'est cependant pas évidente, puisque 50 à 60% du 4-acétylbiphényle introduit dans le milieu, se retrouve en fin de culture sous forme d'une substance également active sur la caroténogénèse et dont le spectre ultraviolet montre un déplacement hypsochromique de 24 nm par rapport à celui du 4-acétylbiphényle. Or un déplacement identique est observé après réduction du 4-acétylbiphényle par le borohydrure de sodium. Le spectre infrarouge confirme effectivement la présence dans la molécule d'une fonction alcool secondaire (bandes à 3620 et 1090 cm^{-1}) et montre de plus une très grande analogie avec celui du 4-(1-hydroxyéthyl) biphényle. Les cristaux ont un point de fusion de $84-86^{\circ}C$ et un pouvoir rotatoire égal à $[\alpha]_D^{20} = -34^{\circ}$. Le champignon réduit vraisemblablement le 4-acétylbiphényle de façon stéréospécifique mais en raison de la faible quantité de produit dont nous disposons et l'absence de données dans la littérature, nous n'avons pas tenté de séparer les isomères éventuels.

c) Benzophénone

Une faible partie seulement (environ 10%) de la benzophénone introduite dans les cultures est métabolisée en diphénylcarbinol qui a été facilement identifié grâce à son spectre ultraviolet très particulier et à son spectre infrarouge. Ainsi que le montre le tableau 4, le diphénylcarbinol possède une activité deux fois plus faible que celle de la benzophénone et l'on peut donc penser que ce dernier composé est le principal responsable de l'inhibition de la pigmentation.

d) 9-fluorénone

Lorsque la croissance du champignon atteint la phase stationnaire, environ 95% de la fluorénone introduite initialement sont transformés en un dérivé dont le spectre ultraviolet présente un déplacement hypsochromique de 20 nm par rapport à celui de la fluorénone. Le spectre infrarouge qui montre l'absence de toute vibration C=O, est en tout point superposable à celui du 9-fluorénol synthétique. L'identité avec ce dernier est d'ailleurs confirmée par le point de fusion $F = 153^{\circ}\text{C}$, litt. 153°C .

En ce qui concerne l'activité du fluorénol vis-à-vis de la caroténogénèse, elle est très voisine de celle de la 9-fluorénone. Il est donc assez difficile de déterminer dans quelle mesure l'inhibition constatée lors des premières expériences est due à la 9-fluorénone ou bien au contraire à son produit de réduction, le 9-fluorénol. Ajoutons cependant que le fluorène qui subit, en culture, une transformation en fluorénol de l'ordre de 5 à 10%, manifeste aussi un certain pouvoir inhibiteur de la pigmentation de M.hiimalis.

e) Diphénylamine

Une très faible fraction de la diphénylamine ajoutée au milieu de culture est métabolisée en un dérivé qui a été identifié à la 4-hydroxydiphénylamine. Ce composé qui inhibe également la pigmentation du champignon diminue considérablement le taux de croissance et pourrait de ce fait, être tenu pour responsable du faible rendement en mycélium des cultures effectuées en présence de diphénylamine.

f) Stilbène

Parmi les substances possédant une action sur la caroténogénèse et dont nous avons étudié le métabolisme, seul le stilbène semble agir directement puisqu'aucun produit de transformation n'a pu être isolé du milieu de culture.

Parmi les composés qui se sont révélés être de bons inhibiteurs de la caroténogénèse, certains subissent donc au cours des cultures des transformations qui donnent naissance à des composés possédant une activité souvent égale à celle de la substance initiale, d'autres au contraire ne semblent subir aucune modification.

2) Discussion

Les dérivés du biphényle ont fait l'objet de très nombreux travaux consacrés à la relation existant entre leur structure moléculaire et leur activité cancérigène mais bien que la nature des substituants portés par la molécule ne soit pas sans importance, il semble que la condition impérieuse pour l'apparition d'une activité soit surtout la coplanarité des deux noyaux phényles (76). Mais l'action bactéricide des dérivés du biphényle ne peut cependant pas être aussi nettement attribuée à une conformation de la molécule (77). Pour notre part, nous avons étudié l'action d'une trentaine de dérivés du biphényle et au total de plus de 170 composés chimiques sur la caroténogénèse de Mucor hiemalis.

Tous les composés qui inhibent la caroténogénèse possèdent deux noyaux benzéniques et c'est pour l'instant la seule corrélation que nous ayons pu établir entre ces différentes substances. La présence nécessaire de deux noyaux benzéniques est d'ailleurs confirmée par le fait que les dérivés du biphényle ou de la diphenylamine ayant un des cycles partiellement hydrogéné perdent le plus souvent toute activité anticaroténogène. De plus aucun des nombreux composés ne comportant qu'un seul noyau aromatique, ne s'est révélé capable d'inhiber de façon durable la caroténogénèse.

Par ailleurs, la position des substituants sur le squelette du biphényle ne semble pas intervenir de façon très marquée dans l'activité anticaroténogène bien que le 4-méthylbiphényle par exemple, soit plus actif que d'autres dérivés méthylés particulièrement en 2 ou 2'.

Cette différence d'activité pourrait être due au fait que les substituants en ortho provoquent une augmentation de l'angle formé par les deux cycles du biphenyle, entraînant donc une diminution de la conjugaison. Le rôle de cette dernière semble d'ailleurs confirmé par l'examen des résultats obtenus avec les composés dont les noyaux sont séparés par différents atomes ou groupes d'atomes. C'est ainsi que le dibenzyle où toute conjugaison entre les deux noyaux est supprimée par les groupes méthyle est sans action sur la caroténogenèse. En revanche, le fluorène et le fluorénol où la coplanarité entre les deux cycles se trouve renforcée, inhibent la pigmentation de M.hiemalis. Il semble que l'on puisse expliquer de la même façon l'activité du stilbène ou des cétones comme la benzophénone ou la fluorénone. En ce qui concerne la diphenylamine, le doublet de l'azote joue plus ou moins le rôle de la double liaison du stilbène, alors que dans le cas du diphenylsulfure ou de l'oxyde de phényle, les atomes de soufre et d'oxygène empêchent toute conjugaison entre les deux cycles (78) et rendent ces composés inactifs vis-à-vis la caroténogenèse.

CHAPITRE III

ACTION DES DIVERS INHIBITEURS ET DE LA LUMIERE SUR LA
SYNTHESE DU PHYTOENE



L'action exercée par la diphénylamine et quelques autres composés sur la caroténogénèse se manifeste essentiellement par une diminution très importante de la teneur en caroténoïdes les plus insaturés, accompagnée d'une augmentation parfois considérable du phytoène et dans quelques cas du phytofluène (10, 67, 79). Ce phénomène a été mis à profit à différentes reprises afin de vérifier le rôle éventuel du phytoène en tant que précurseur des autres caroténoïdes (80). Dans ces expériences, la stéréochimie du phytoène et l'influence possible de différents facteurs, en particulier de la lumière, n'ont pas été, semble-t-il, pris en considération.

On sait cependant depuis longtemps que la lumière joue un rôle très important dans le déclenchement de la caroténogénèse de certains microorganismes comme Neurospora crassa (81), Fusarium aquaeductum (82) ou Verticillium agaricinum (83) qui n'élaborent à l'obscurité que des quantités très faibles de caroténoïdes et dont la pigmentation normale nécessite, à la fois, un éclaircissement plus ou moins important et la présence d'oxygène. Cette double exigence peut s'expliquer soit par l'existence possible d'un répresseur de la caroténogénèse qui serait alors détruit par photooxydation lorsque les cultures sont effectuées en aérobiose à la lumière, soit par la présence dans les cultures maintenues à l'obscurité, d'un composé qui ne jouerait un rôle d'inducteur qu'après photooxydation (84).

D'autres champignons comme Phycomyces blakesleeianus (85), Penicillium sclerotiorum (86) sont en revanche capables de synthétiser tous leurs caroténoïdes à l'obscurité mais en quantité plus faible qu'à la lumière.

La stimulation de la caroténogénèse par la lumière peut s'exercer sans doute à différents niveaux comme par exemple la cyclisation, mais il ne peut être exclu a priori qu'elle intervienne aussi dans la synthèse des précurseurs incolores

comme le phytoène. Si tel est le cas, l'action même des inhibiteurs de la caroténogenèse peut être aussi modifiée et il semble donc important d'étudier comparativement l'action de la lumière sur la synthèse du phytoène en présence et en absence d'inhibiteur.

A.- ACTIVITE COMPAREE DE QUELQUES INHIBITEURS

Malgré le nombre relativement important de substances testées, une dizaine seulement ont été retenues et les résultats concernant leur action sur la biosynthèse des pigments dans les cultures réalisées à la lumière du jour sont rassemblés dans le tableau 4.

TABLEAU 4

Action de différents inhibiteurs sur la caroténogenèse de Mucor hiemalis

Inhibiteur	Concentration molaire	Durée des cultures (jours)	Phytoène	Autres caroténoïdes
4-acétylbiphényle	10^{-4}	5	2155	0
Benzophénone	$2,2.10^{-4}$	5	2609	0
Diphénylcarbinol	$5,5.10^{-4}$	6	2913	0
9-fluorénone	$5,5.10^{-4}$	6	2370	0
9-fluorénol	$5,5.10^{-4}$	5	1960	traces
3,3'-diméthoxy-biphényle	10^{-4}	7	2313	traces
3-chloro-4-méthoxy-biphényle	$3,6.10^{-4}$	7	2758	traces
Fluorène	3.10^{-4}	5	1960	261
Stilbène	$2,8.10^{-4}$	12	3160	176
1,1-diphényléthanol	4.10^{-4}	6	1215	135
Alcool phénéthylique	$1,2.10^{-4}$	6	3823	253

Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/g}$ de mycélium sec.

D'après le tableau 4, l'introduction des inhibiteurs dans le milieu de culture se traduit par un blocage plus ou moins strict de la carotenogénèse avec accumulation d'une quantité de phytoène sensiblement égale à celle des pigments totaux d'une culture effectuée en absence d'inhibiteur. On constate par ailleurs que les composés les plus actifs sont le 3,3'-diméthoxybiphényle et le 4-acétylbiphényle dont la concentration minimale d'action peut atteindre $2,5 \cdot 10^{-5} M$, toutefois le 3,3'-diméthoxybiphényle inhibe la croissance de façon assez sensible et son étude n'a pas été poursuivie.

Si le phénomène d'accumulation du phytoène que nous observons est sensiblement du même ordre de grandeur que celui obtenu par d'autres auteurs avec la diphénylamine, nous notons cependant des différences importantes en ce qui concerne la stéréochimie du phytoène isolé. Nous avons vu au Chapitre I, que trois isomères du phytoène ont pu être isolés à partir de cultures de M.hiernalis effectuées en présence de fluorénone et nous avons donc recherché s'il existe une relation entre la nature de l'inhibiteur et la présence de ces isomères dans le milieu de culture. Une partie de ces résultats est consignée dans le tableau 5.

TABLEAU 5

Influence de la nature de l'inhibiteur sur la synthèse des isomères du phytoène.

Inhibiteur	Durée (jours)	Phytoène 15-cis	Phytoène all-trans	Phytoène 13-cis	Autres pigments	A
9-fluorénone	4	658	2090	416	0	66
9-fluorénol	5	526	1290	144	0	66
4-acétylbiphényle	5	427	150	0	0	30
Benzophénone	5	1640	720	0	0	30
Diphénylcarbinol	6	2239	641	0	0	21
3-chloro-4-méthoxy-biphényle	7	2360	398	0	0	17
3,3'-diméthoxy-biphényle	7	2156	189	0	0	8
1,1-diphényléthanol	6	1215	0	0	135	0
4-hydroxybenzo-phénone	6	2754	0	0	240	0
Alcool phénéthylique	6	3823	0	0	253	0

Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/g}$ de mycélium sec.

$$A = \% \frac{\text{Phytoène-all-trans}}{\text{Phytoène total}}$$

C'est sans conteste la fluorénone et le fluorénol qui conduisent à la plus forte accumulation d'isomères all-trans et les seuls inhibiteurs à fournir du phytoène-13-cis. L'action du 1,1-diphényléthanol, de la 4-hydroxybenzophénone et de l'alcool phénéthylique semble moins efficace que celle des autres composés puisqu'une certaine quantité de pigments, assez faible cependant, est retrouvée dans ces conditions. Il faut

toutefois remarquer que la quantité de phytoène-15-cis accumulée est relativement élevée et ne se trouve pas accompagnée, comme dans les autres cas, de phytoène-all-trans.

B.- INFLUENCE DE LA LUMIERE SUR LA FORMATION DES ISOMERES DU PHYTOENE.

Avant d'aborder cette étude, il est important de déterminer dans un premier temps l'influence que la lumière exerce sur la synthèse des caroténoïdes de M.hiemaleis cultivé en absence d'inhibiteur. A cet effet, les cultures sont effectuées durant des temps variables soit à l'obscurité totale soit à la lumière du jour et les résultats des dosages des différents polyènes figurent dans le tableau 6.

TABEAU 6

Influence de la lumière du jour sur la composition en caroténoïdes de M.hiemaleis

	Obscurité 4 jours	Lumière 4 jours	Obscurité 7 jours	lumière 7 jours
Phytoène	157	435	364	513
Phytofluène	5	12	43	28
β -carotène	268	680	330	981
β -zeacarotène	traces	10	13	13
ζ -carotène	0	15	14	19
γ -carotène	0	12	14	17
Neurosporène	0	6	10	14
Lycopène	0	4	3	11
Total	430	1174	791	1596

Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/g}$ de matière sèche.

D'après les résultats mentionnés dans le tableau 6, on constate que la lumière ne représente pas pour Mucor hiemalis un facteur indispensable à la synthèse des caroténoïdes. Elle augmente cependant de façon très importante la quantité de pigments synthétisés et l'effet est encore plus marqué lorsque les cultures sont soumises à un éclairage à la fois continu et plus intense. Ainsi, pour une culture maintenue sous 8000 Lux pendant 7 jours, nous avons obtenu par gramme de mycélium sec : 984 μg de phytoène, 2272 μg de β -carotène, 190 μg de neurosporène et 34 μg pour l'ensemble zeacarotène, ζ -carotène soit au total 3480 μg de pigments. Si l'on compare ces résultats avec ceux obtenus à la lumière du jour pour la même durée de culture, on constate que la synthèse des caroténoïdes a plus que doublé et qu'un éclairage continu semble beaucoup plus efficace sur la pigmentation de M.hiemalis que ne le sont des photopériodes même de durée relativement longue (12 heures environ). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus chez Phycomyces (73) et Flavobacterium (87).

L'illumination n'a pas cependant pour seul effet de modifier la teneur en caroténoïdes car nous avons en effet caractérisé à différentes reprises du phytoène-trans dans les cultures éclairées . Sa présence en quantité plus ou moins importante semble cependant dépendre de l'âge du mycélium et c'est pourquoi nous avons étudié l'évolution des différents caroténoïdes en fonction du temps. Lorsque la durée de l'expérience n'excède pas 48 heures, nous avons toujours pu mettre en évidence la formation de phytoène-trans qui représente en moyenne 3 à 4% du phytoène total. Au bout de 4 jours, alors que la pigmentation du mycélium devient relativement importante ce taux n'est plus, en revanche que de 0,6% et après 6 jours, le phytoène-trans n'est plus décelable. Ceci tend donc à montrer que lorsque la caroténogénèse est importante, la vitesse de transformation du phytoène-trans est suffisante pour que ce dernier échappe à la détection.

Nous avons donc repris ces expériences en présence d'inhibiteurs de la caroténogénèse de façon à empêcher toute utilisation du phytoène dans les réactions de désaturation. De plus, les cultures ont été réalisées soit à l'obscurité totale soit sous éclairage continu de manière à pouvoir préciser la part d'influence revenant plus spécialement à la lumière dans la formation du phytoène-trans. Le tableau 7 rassemble les résultats de ces expériences.

TABLEAU 7

Influence d'un éclairage continu ou de l'obscurité totale sur la biosynthèse du phytoène en présence de différents inhibiteurs.

Inhibiteur	Conditions	Durée (jours)	Phytoène 15-cis	Phytoène all-trans	A
enzophénone	Lumière	5	1640	720	30
	Obscurité	5	118	0	0
-acétylbiphényle	Lumière	5	427	190	30
	Obscurité	5	411	0	0
-fluorénone	Lumière	3	1900	393	17
	"	5	584	1392	70
	"	6	1175	1351	54
	"	6	1063	1137	51
-fluorénone	Obscurité	3	406	20	4
	"	3	500	127	20
	"	5	1323	100	7
	"	5	1733	0	0
	"	6	1580	0	0
	"	6	1615	0	0

Les résultats sont exprimés en µg/g de mycélium sec.

$$A = \% \frac{\text{Phytoène-all-trans}}{\text{Phytoène total}}$$

De l'examen de ce tableau, il ressort que pour un inhibiteur donné, la différence entre la quantité totale de phytoène synthétisé à l'obscurité et sous éclairage constant est telle qu'il ne fait aucun doute que la lumière stimule la synthèse du phytoène-cis et surtout celle de son isomère trans. Il faut cependant noter que si la synthèse de ce dernier croît en fonction du temps lorsque les cultures sont éclairées, ce phénomène s'inverse dans les cultures maintenues à l'obscurité.

L'origine de la stimulation de la synthèse du phytoène s'explique difficilement, mais il faut noter que lorsque l'intensité de l'éclairage est doublée ou triplée, la quantité de phytoène-trans qui se forme subit sensiblement les mêmes variations (Tableau 8).

TABEAU 8

Influence de l'intensité lumineuse sur la synthèse du phytoène de Mucor hiemalis cultivé en présence de fluorénone.

Essais	Phytoène 15-cis	Phytoène 13-cis	Phytoène all-trans	A
I	1900	0	393	17,1
II	1190	0	730	38,0
III	142	1132	1875	59,6

Les résultats sont exprimés en µg/g de matière sèche. Les intensités d'éclairage dans les différents essais I, II et III sont dans un rapport 1,2 et 3.

$$A = \% \frac{\text{Phytoène-all-trans}}{\text{Phytoène total}}$$

Ce résultat laisse soupçonner l'existence d'un phénomène d'isomérisation photochimique du phytoène-cis. Cette interprétation semble d'ailleurs confirmée par le fait que si une culture préalablement effectuée en présence de fluorénone à l'obscurité et ne contenant que du phytoène-cis, est transportée à la lumière, le phytoène-trans représente 58% du phytoène total au bout de 6 heures. Il faut cependant remarquer que les récipients en verre Pyrex servant aux cultures sont pratiquement opaques aux longueurs d'onde inférieures à 285 nm ce qui rend hautement improbable une isomérisation directe du phytoène. Il semble donc vraisemblable que la fluorénone qui possède entre autre une bande d'absorption à 410 nm joue un rôle de photosensibilisateur.

L'emploi de filtres liquides à large bande passante montre effectivement que le domaine des longueurs d'onde où la formation de phytoène-trans est observée dans les cultures contenant de la fluorénone, se situe entre 380 et 450 nm. Les expériences réalisées in vitro confirment par ailleurs le rôle de la fluorénone dans l'isomérisation du phytoène. En effet, si une solution éthéro-pétrolique de phytoène-cis est placée dans le faisceau d'une lampe Attralux Spot, aucune isomérisation n'intervient même au bout de plusieurs heures. Dans le cas où la même solution est additionnée d'une quantité équimoléculaire de fluorénone, 70% environ du phytoène sont transformés en isomère trans au bout de 3 à 4 heures. Cette expérience qui a été reproduite de nombreuses fois soit à partir de phytoène-cis, soit à partir de phytoène-trans, conduit dans tous les cas au même état photostationnaire caractérisé par 30% d'isomère cis et 70% d'isomère trans (88). Le même phénomène est également obtenu avec la benzophénone et le 4-acétylbiphényle, toutefois la valeur de l'équilibre photostationnaire est différente dans chaque cas.

Différents mécanismes peuvent être envisagés pour rendre compte de l'isomérisation cis-trans du phytoène par les inhibiteurs de la caroténogénèse, mais il semble bien à la suite des travaux de HAMMOND (89) et de MAUDINAS (90) qu'un transfert d'énergie triplet-triplet soit le principal responsable du phénomène constaté. En effet, l'énergie de l'état triplet le plus bas du phytoène est comprise entre 47 et 48 kcal/mole⁻¹ et donc bien inférieure à celle mesurée pour la fluorénone (53 kcal/mole⁻¹), la benzophénone (69 kcal/mole⁻¹) ou le 4-acétylbiphényle (61 kcal/mole⁻¹) ce qui rend parfaitement probable l'existence d'un tel mécanisme.

Il est cependant certain que la formation in vivo du phytoène-trans ne peut être entièrement attribuée à la photo-isomérisation du phytoène-cis. En effet, dans les cultures effectuées en présence de fluorénone à l'obscurité totale, le taux de l'isomère trans peut atteindre jusqu'à 20% du phytoène total (Tableau 7), ce qui permet de ne pas mettre en doute, l'existence d'une synthèse d'origine enzymatique, dans le cas des cultures effectuées à la lumière.

C.- LEVEES D'INHIBITION DE LA CAROTENOGENESE

Les cultures inhibées par la fluorénone et contenant une forte proportion de phytoène-all-trans, constituent a priori un excellent matériel pour étudier le rôle de cet isomère en tant que précurseur éventuel des autres caroténoïdes.

Les levées d'inhibition sont effectuées en tampon phosphate de potassium M/15 après avoir soigneusement lavé le mycélium à l'aide de la même solution. Au bout de quelques heures, la masse cellulaire se pigmente très légèrement et contrairement à ce qui a été signalé dans le cas de Rhodotorula (74), la pigmentation ne s'intensifie pas au cours du temps.

Cette difficulté a déjà été rencontrée par d'autres auteurs qui dans certains cas ont obtenu toutefois de bons résultats après avoir ajouté du glucose à la solution tampon (91). Cet artifice ne nous a cependant apporté aucune amélioration et nous avons alors tenté de vérifier différentes hypothèses pouvant expliquer les raisons de ces échecs.

En premier lieu, nous avons supposé que la mise en suspension de la masse mycélienne dans une simple solution de phosphate ne permet pas d'assurer aux cellules des conditions de survie compatibles avec une caroténogenèse normale. Nous avons donc après lavage du mycélium remis celui-ci en suspension dans un milieu qui ne diffère du milieu normal que par l'absence de source azotée (Essai A). Nous avons envisagé l'éventualité de l'élaboration par le champignon, durant la culture, de substances hydrosolubles favorisant la caroténogenèse. La perte de ces substances par élimination du milieu et à plus forte raison lors des lavages du mycélium, serait alors responsable de la mauvaise levée d'inhibition. Le mycélium provenant d'une culture de 6 jours est soigneusement lavé puis remis en suspension dans son propre milieu débarrassé de la fluorénone et du fluorénol (Essai B). Il n'est toutefois pas impossible que les substances actives élaborées par le champignon soient relativement plus solubles dans les solvants organiques que dans l'eau et se trouvent alors éliminées lors de l'extraction de la fluorénone. Nous avons donc tenté un dernier essai où le milieu d'incubation est celui d'une culture sans inhibiteur dont le mycélium est éliminé et remplacé par celui provenant d'un essai réalisé en présence de fluorénone (Essai C). Les résultats de ces différentes expériences font l'objet du tableau 9.

TABEAU 9

Essais de levées d'inhibition de la caroténogenèse de Mucor hiemalis effectuées dans diverses conditions.

Essais	T	A	T	B	T	C
Durée en jours	5	2	6	2	4	3
Phytoène-15-cis	90	986	138	936	285	158
Phytoène-13-cis	1076	165	1414	430	1126	22
Phytoène-all-trans	1573	505	2660	1115	1617	60
Autres caroténoïdes	0	296	0	794	0	95
Total	2739	1952	4212	3275	3028	336
% <u>Phytoène-15-cis</u> Phytoène total	3,2	50,2	3,2	28,5	9,4	46,
% <u>Phytoène-13-cis</u> Phytoène total	39,2	8,4	33,5	13,1	31,7	6,
% <u>Phytoène-all-trans</u> Phytoène total	57,4	25,8	63,1	34,0	53,4	17,

T : avant levée d'inhibition (fluorénone)

A : essai de levée d'inhibition dans un milieu carencé en azote

B : essai de levée d'inhibition dans un filtrat de culture après élimination de la fluorénone

C : essai de levée d'inhibition dans un filtrat de culture normale

Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/g}$ de matière sèche.

Bien que la pigmentation du mycélium dans l'essai A soit un peu plus intense que lors des levées d'inhibition en absence de glucose, la quantité de pigments formés reste anormalement basse. Le tableau 9 montre qu'un meilleur rendement est obtenu dans l'essai B mais surtout dans l'essai C où la quantité de caroténoïdes synthétisés de novo est trois fois plus élevée que dans l'essai A.

De plus, bien que l'on constate une perte en polyènes, ces essais révèlent que la désaturation du phytoène reste très limitée. Cependant, un certain nombre de remarques peuvent être formulées au sujet de l'évolution des différents isomères du phytoène. Il faut noter en effet, qu'avant la levée d'inhibition, la teneur en isomères 15-cis n'excède en aucun cas 10% du phytoène total, alors qu'elle représente jusqu'à 50% en fin d'expérience. De plus, les isomères 13-cis et all-trans diminuent de façon considérable après élimination de l'inhibiteur, ce qui démontre qu'ils sont métabolisables et vraisemblablement précurseurs du phytoène-15-cis. Néanmoins, on ne peut exclure qu'ils soient également précurseurs du phytofluène-trans, comme cela a été suggéré récemment par d'autres auteurs (92) mais actuellement aucune expérimentation ne permet de faire un choix entre ces deux hypothèses. Par ailleurs, le fait que le phytoène-15-cis s'accumule dans le mycélium et en particulier dans les globules lipidiques, ainsi que nous le verrons ultérieurement, soulève un certain nombre de questions auxquelles il est encore difficile de répondre autrement que sous forme d'hypothèse. Certains auteurs, en effet, pensent que le phytoène ne peut être métabolisé que dans la mesure où il n'a pas quitté le complexe qu'il forme dès l'achèvement de sa synthèse avec l'enzyme chargé de sa transformation. La plus grande partie du phytoène libre et directement extractible de la cellule serait alors métaboliquement inactive. Cette hypothèse, séduisante à plus d'un titre, permettrait par ailleurs d'expliquer que, lors des levées d'inhibition seule une très faible partie du phytoène accumulé soit transformée en polyènes plus insaturés.



CHAPITRE IV

SPECIFICITE D'ACTION DES INHIBITEURS DE LA CAROTENOGENESE



L'action de la diphénylamine sur la caroténogénèse a souvent été considérée comme spécifique et cependant diverses observations montrent que ce composé est capable d'inhiber la synthèse de la vitamine K₂ chez Staphylococcus aureus (94), de modifier celle de certains acides gras chez Chromobacterium violaceum et plus généralement d'altérer de façon sensible la formation des lipides essentiellement localisés dans les systèmes membranaires (95). De même, le 2-hydroxybiphényle utilisé pour bloquer la caroténogénèse des levures (74) intervient également dans d'autres activités de la cellule. Il inhibe en effet certains enzymes du cycle tricarboxylique tels que l'isocitrate déshydrogénase et la succinate déshydrogénase de divers champignons (96) ainsi que l'excrétion des porphyrines chez Rhodotorula mucilaginosa (74).

Ces résultats nous ont donc incités à examiner dans quelle mesure les inhibiteurs que nous avons sélectionnés, et particulièrement la fluorénone, présentent une spécificité étroite vis-à-vis de la caroténogénèse et n'influencent pas de manière importante d'autres métabolismes.

A.- INFLUENCE DE LA FLUORENONE SUR LA LIPOGENESE DE MUCOR HIEMALIS.

Si au début de la croissance on peut mettre en évidence une légère différence quant à la quantité de lipides totaux synthétisés dans les cultures effectuées en présence ou en absence de fluorénone, cette différence s'atténue très rapidement au cours du temps.

De plus, nous avons constaté qu'au bout de 5 jours la quantité de mono, di ou triglycérides ou de phospholipides élaborés dans chaque cas est sensiblement identique.

La composition en acides gras des lipides totaux subit en revanche sous l'influence de la fluorénone des altérations qui se sont révélées reproductibles au cours des différents essais et les résultats concernant deux de ceux-ci font l'objet du tableau 10.

TABLEAU 10

Composition en acides gras de M.hiemalis cultivé en présence ou absence de fluorénone

Acides gras	Témoin 3 jours	Fluorénone 3 jours	Témoin 6 jours	Fluorénone 6 jours
10:0	0,3	0,3	traces	traces
12:0	0,6	0,9	0,2	0,4
14:0	1,9	2,4	1,7	0,9
15:0	0,2	0,5	traces	traces
16:0	22,8	12,5	22,1	9,0
16:1	3,2	3,7	3,1	3,0
18:0	2,9	5,1	1,0	3,8
18:1	36,2	50,3	40,6	64,5
18:2	14,6	13,2	13,4	9,0
18:3	17,4	10,7	17,6	9,0
Saturés	28,0	21,7	25,0	14,1
Insaturés	71,0	77,9	74,7	85,5

Les résultats sont exprimés en % des acides gras totaux.

D'après ce tableau, on constate que comme pour beaucoup de Mucorales, la production d'acides gras insaturés de Mucor hiemalis est élevée dans les cultures normales. L'acide oléique représente en effet le composé majeur, associé par ailleurs aux acides linoléique et γ -linolénique ($\Delta^{6,9,12}$) déjà mis en évidence dans ce groupe de champignons (97). En ce qui concerne les acides gras saturés, leur taux ne dépasse pas 30% et l'acide palmitique prédomine très largement.

Dans les cultures effectuées en présence de fluorénone, la proportion d'acides insaturés est encore un peu plus élevée que dans les cultures normales mais il faut alors noter que ce phénomène résulte à la fois d'une augmentation appréciable de la quantité d'acide oléique et d'une légère diminution de celle des acides linoléique et linolénique. Les variations de la teneur en différents acides gras saturés sont assez marquées et l'on constate en particulier une augmentation sensible du taux de l'acide stéarique alors que celui de l'acide palmitique diminue; ce dernier restant cependant le dérivé saturé le plus abondant au sein du mélange.

L'origine de telles variations est difficile à localiser dans l'état actuel de nos connaissances sur les mécanismes de biosynthèse des acides gras insaturés chez les champignons. On peut admettre cependant du fait que les acides di et triinsaturés en C_{18} sont formés par désaturation de l'acide oléique (98) que la fluorénone peut freiner ce processus en même temps qu'elle inhibe la désaturation du phytoène. Nous avons également envisagé une isomérisation possible de l'acide oléique sous l'influence de la fluorénone. On sait en effet que la désaturase des acides monoéniques montre une spécificité étroite vis-à-vis de la configuration du substrat (99) et donc qu'une isomérisation cis-trans de l'acide oléique pourrait conduire à l'accumulation d'acide éléïdique non métabolisable. Ceci permettrait alors de rendre compte de la diminution de la teneur en acides linoléique et linolénique. En fait,

la chromatographie sur gel de silice imprégné de nitrate d'argent (100) ne met en évidence que l'acide oléique et exclut de ce fait toute participation d'un phénomène d'isomérisation à la diminution de la synthèse des acides C_{18:2} et C_{18:3}.

B.- INFLUENCE DES INHIBITEURS DE LA CAROTENOGENESE SUR LA SYNTHÈSE DES STÉROLS.

La synthèse des stérols faisant appel jusqu'au stade de pyrophosphate de farnésyle aux mêmes précurseurs que la synthèse des caroténoïdes, il est tentant d'examiner quelle influence pourrait avoir l'inhibition de la caroténogénèse sur la formation des stérols de Mucor hiemalis. Au cours de cette étude, nous avons surtout cherché à mettre en évidence des variations quantitatives de la teneur en stérols à partir de mycélium provenant de cultures effectuées en présence des différents inhibiteurs que nous avons décrits précédemment. De plus, au cours de la séparation des différentes classes de lipides, nous avons remarqué que la majorité des stérols des cultures normales se trouve sous forme estérifiée alors que généralement chez les champignons la forme alcool libre prédomine très nettement (101). Il nous a donc semblé intéressant de vérifier également, si à la suite de l'inhibition de la caroténogénèse, la proportion des stérols estérifiés par rapport aux stérols libres subissait des variations importantes.

En fait nous n'avons jamais mis en évidence de différence significative entre les teneurs en stérols des cultures réalisées en présence ou en absence de fluorénone. Une étude similaire réalisée avec Phycomyces blakesleeana conduit à la même conclusion (102). Nous tenons toutefois à souligner que la quantité de stérols élaborés par Mucor hiemalis dans nos conditions de culture, se situe de façon très constante aux

environs de 2% du poids de mycélium sec et se trouve donc être 10 à 20 fois supérieure à celle déjà rapportée pour la même espèce de champignon (103).

La présence de fluorénone dans le milieu de culture ne semble pas non plus modifier de façon appréciable la proportion de stérols libres par rapport à celle des stérols estérifiés qui reste dans tous les cas voisine de 25%.

Ces résultats ne permettent cependant pas de conclure que l'inhibition de la caroténogénèse n'entraîne aucune perturbation du métabolisme des stérols car il ne peut être exclu que la fluorénone modifie plus ou moins profondément la composition en stérols de Mucor hiemalis, normalement caractérisée par la prédominance de 22-dihydroergostérol (103).

C.- INFLUENCE DES INHIBITEURS DE LA CAROTENOGENESE SUR LA SYNTHÈSE DES UBIQUINONES.

L'addition de diphénylamine au milieu de culture de Rhodospirillum rubrum amène en plus de l'inhibition de la caroténogénèse une nette diminution du taux d'ubiquinones (104). Le 2-hydroxybiphényle réduit également de 50% la teneur en ubiquinones de cette bactérie ainsi que celle de Rhodotorula mucilaginosa (106). Les ubiquinones pouvant jouer un rôle dans la désaturation du phytoène (106), il nous a paru important de vérifier si chez Mucor hiemalis l'action des différents inhibiteurs de la caroténogénèse s'accompagne également d'une baisse importante de la quantité d'ubiquinones.

Nous avons effectué des cultures en présence de benzophénone et de 4-acétylbiphényle dans les conditions déjà décrites. Au bout de 5 jours, le mycélium a été dans chaque cas traité par une solution alcoolique de potasse puis chauffé à reflux en présence de pyrogallol comme antioxydant.

Après extraction à l'éther, l'ubiquinone (UQ 9) a été séparée par chromatographie sur alumine alcaline Woelm et dosée par spectrophotométrie.

Bien que les valeurs obtenues (0,65 μ mole/g de mycelium sec) soient trois fois supérieures à celles signalées jusqu'ici pour les Mucorales (107), la comparaison des résultats montre qu'aucune différence n'existe à ce point de vue entre les cultures normales et celles dont la caroténogénèse est inhibée. Nous devons donc conclure que l'absence de désaturation du phytoène n'est pas directement liée à une éventuelle altération de la chaîne transporteur d'électrons et qui serait due à une carence en ubiquinone.

D.- INFLUENCE DES INHIBITEURS DE LA CAROTENOGENESE SUR LA SYNTHÈSE DES FLAVINES.

Le rôle des flavines en tant que cofacteur des déshydrogénases n'est plus à démontrer et si leur rôle dans la synthèse du phytoène reste contesté, elles interviendraient en revanche dans la désaturation de ce dernier (65). Par ailleurs, les flavines sont capables de provoquer des photoisomérisations mises surtout en évidence in vitro (108). Cependant du fait de l'association des caroténoïdes et des flavines au sein de complexes photorécepteurs (109) une interaction pourrait exister entre ces composés au cours d'un processus photobiologique. Il a été de plus signalé par différents auteurs que la riboflavine est capable de lever l'inhibition de la caroténogénèse provoquée par la diphénylamine (110) ou par le 2-hydroxybiphényle (106). Ces résultats n'ont pas été, à notre connaissance, confirmés jusqu'à présent.

Ces différentes considérations nous ont incités à rechercher d'une part dans quelle mesure une diminution du taux de flavines ne serait pas à l'origine de l'accumulation du phytoène dans les cultures effectuées en présence d'inhibiteurs de la caroténogénèse et d'autre part si la présence de phytoène-trans en particulier dans les cultures normales illuminées ne serait pas due à une action photochimique des flavines.

Nous avons effectué des cultures de durée variable et pour chacune d'elles un essai à l'obscurité totale et un à la lumière ont été réalisés aussi bien en absence qu'en présence d'inhibiteur de la pigmentation. Après, extraction, les flavines ont été séparées sur colonne de Florisil puis dosées par fluorimétrie avant et après réduction du FAD en FMN par l'hydro-sulfite de sodium.

Une assez grande dispersion des résultats ne permet pas de tirer de conclusions définitives, mais les différences enregistrées sont suffisamment faibles pour penser que ni la présence de l'inhibiteur ni celle de la lumière ne modifient de façon significative la teneur en flavines de Mucor hiemalis. En revanche, celle-ci est nettement influencée par la durée de la culture dans le sens d'une augmentation en fonction du temps sans toutefois lui être directement proportionnelle. De telles variations ont déjà été enregistrées chez des levures et chez Saccharomyces cerevisiae, par exemple, dont la flavinogénèse est caractérisée par deux étapes bien distinctes au cours de la croissance (44). On sait d'ailleurs que la synthèse des flavines chez les microorganismes n'est pas ajustée aux besoins physiologiques de la cellule, le cas extrême étant celui d'Eremothecium ashbyii dont les filtrats de culture peuvent contenir jusqu'à 1 g de riboflavine par litre (111).

Nos essais concernant le rôle possible des flavines dans la photoisomérisation du phytoène-cis ont été réalisés in vitro à partir d'une solution équimoléculaire de phytoène

et de riboflavine. Les irradiations ont été réalisées en plaçant les solutions à 20 cm d'une lampe Philips Attralux spot de 150 W et comme dans le cas de la fluorénone, des précautions ont été prises afin d'éliminer le rayonnement infrarouge. Des prélèvements ont été effectués à différents intervalles de temps pour des durées d'irradiation allant de 5 mn à 20 heures et le spectre du phytoène a été établi de la manière habituelle.

Quelle que soit la durée de l'expérience, nous n'avons jamais constaté de modification du spectre du phytoène sauf dans la plupart des cas une diminution plus ou moins sensible de la densité optique correspondant à une photodestruction du polyène. Il semble donc exclu, à l'inverse des résultats que nous avons déjà exposés pour la fluorénone, que les flavines puissent jouer un rôle de photosensibilisateur dans l'isomérisation du phytoène. Ce résultat rend donc encore plus crédible l'origine enzymatique du phytoène-trans mis en évidence dans les cultures effectuées sans inhibiteur.

E.- INFLUENCE DE LA FLUORENONE SUR LA MORPHOLOGIE

Des variations de l'épaisseur de la paroi entre une forme pigmentée et une forme non pigmentée ont été observées chez Blakeslea trispora (112) et Dacryopinax spathularia (113), la paroi étant nettement plus épaisse lorsque ces champignons synthétisent des caroténoïdes. La diphénylamine induit par ailleurs une augmentation de la taille des cellules de Rhodotorula rubra pouvant aller jusqu'au double de celle des cellules normales (114).

C'est pourquoi, nous avons cherché à déterminer si l'inhibition de la pigmentation provoquée par la fluorénone s'accompagne également chez Mucor hiemalis de modifications morphologiques.

L'examen en microscopie photonique du mycélium pigmenté ou non, montre toujours des hyphes plus ou moins ramifiés qui présentent à certains endroits des spores intercalaires ou chlamydospores (pl.I, fig.1) et une accumulation importante de globules lipidiques dans les parties âgées (pl.I, fig.2). Nous avons également constaté dans les cultures jeunes et même en absence d'inhibiteur, que l'apex de certains hyphes se termine par un renflement assez semblable à celui observé et étudié chez Mucor rouxii (115). Ce phénomène n'a pas encore reçu d'explication satisfaisante mais on avance l'hypothèse qu'il serait dû à un déséquilibre entre les activités des enzymes de synthèse et de dégradation de la paroi.

Pour l'examen en microscopie électronique, les coupes transversales ont été réalisées dans la majorité des cas, dans la zone sous-apicale riche en mitochondries, noyaux et réticulum endoplasmique ou dans la zone distale richement vacuolisée et contenant des inclusions de nature lipidique. Ces coupes montrent, dans le cas des cultures normales (pl.II, fig.7), la présence d'un assez grand nombre de globules lipidiques qui font l'objet d'un examen plus approfondi au chapitre VI. On note par ailleurs (pl.II, fig.9), que les mitochondries se présentent sous forme soit arrondie soit allongée avec des crêtes de type lamellaire et parallèles entre elles. Les noyaux, dont les deux feuilletts de la membrane nucléaire sont nettement visibles, sont souvent entourés par le réticulum endoplasmique bien développé. On remarque de plus, l'absence de ribosomes due à la fixation par le permanganate de potassium.

Dans les cellules provenant de cultures effectuées en présence de fluorénone (pl.II, fig.12), les mitochondries sont de taille plus faible que précédemment. Elles apparaissent allongées suivant l'axe principal de l'hyphe et présentent aussi des crêtes moins nombreuses et moins développées.

L'inhibition de la caroténogenèse par de très fortes doses de 2-hydroxybiphényle s'accompagne parfois chez Rhodospirillum rubrum d'une dislocation du système membranaire intracytoplasmique, suivie d'un réarrangement particulier (116). La fluorénone ne semble pas induire de telles modifications chez Mucor hiemalis mais on note cependant une fragmentation du réticulum endoplasmique sous forme de nombreuses vésicules alignées le long du plasmalemme (pl.II, fig.12). L'intervention de la fluorénone dans ce phénomène n'est cependant pas certaine, car on observe également dans les cellules provenant de cultures normales des chaînettes de vésicules plus ou moins irrégulières (pl.II, fig.10).

L'influence de la fluorénone sur l'épaisseur de la paroi est en revanche manifeste. En effet, si la paroi mesure dans les conditions normales 0,3 à 0,4 μ , elle ne dépasse pas pour les cellules ayant poussé en présence de fluorénone 0,1 à 0,13 μ . De plus, elle ne semble présenter dans ce dernier cas qu'une seule couche alors que dans le cas des hyphes normaux on peut en observer plusieurs dont deux sont en général plus marquées.

CHAPITRE V

INFLUENCE DE L'ANAEROBIOSE SUR LA FORMATION DES CAROTENOIDES
ET DIFFERENTS COMPOSES LIPIDIQUES AINSI QUE SUR LA MORPHOLOGIE
DE MUCOR HIEMALIS



Le rôle de l'oxygène dans l'étape finale de la biosynthèse des caroténoïdes de Neurospora crassa a été souligné par différents auteurs qui ont montré que lorsque ce champignon, après croissance à l'obscurité, est exposé ensuite à la lumière sous atmosphère d'azote, il ne produit pas de caroténoïdes (117,118,119). Ce phénomène a été mis en évidence dans les mêmes conditions chez Fusarium aquaeductum, cependant les enzymes responsables de la caroténogenèse sont synthétisés en absence d'oxygène (120). Chez Mycobacterium, l'oxygène interviendrait comme accepteur d'électrons pour garder le photorécepteur à l'état oxydé (84).

Cependant, les observations concernant le rôle de l'oxygène dans la biosynthèse des pigments par des extraits enzymatiques paraissent être en contradiction avec les résultats précédents. En effet, l'oxygène n'interviendrait pas dans la formation du phytoène par incubation de pyrophosphate de géranylgéranyle avec un extrait enzymatique (29) et de même la synthèse des polyènes colorés serait maximale en anaérobiose (121). Ces divergences nous ont paru très importantes et c'est pourquoi nous avons étudié l'influence de la privation en oxygène des cultures sur la synthèse des caroténoïdes de M.hiemaleis.

Peu de champignons filamenteux sont capables de se multiplier en anaérobiose stricte et, parmi les Phycomycètes, seules quelques espèces comme M.rouxii, M.racemosus, M.subtilissimus et Rhizopus oryzae présentent une croissance acceptable quand ils sont cultivés sous azote ou anhydride carbonique (122). Si la croissance sous azote de notre souche s'est révélée être assez faible dans le milieu de base, elle s'est montrée très satisfaisante après addition d'extrait de levure. Cette exigence en facteurs nutritifs a déjà été signalée pour d'autres espèces de Mucor (123) et l'on sait également que Saccharomyces cerevisiae ne peut se multiplier en anaérobiose stricte que si l'on ajoute au milieu de l'ergostérol ou des

acides gras insaturés qui ne sont pas synthétisés par les cellules en quantité suffisante dans ces conditions (124, 125).

Nous avons donc également étudié la répercussion de la privation en oxygène des cultures sur la synthèse des stérols et des acides gras. Nos essais ont été effectués en assurant l'anaérobiose par un barbotage d'azote, d'anhydride carbonique, d'hydrogène ou d'éthylène. Le choix de ce dernier peut paraître surprenant mais Mucor hiemalis étant responsable avec d'autres souches de champignons, de la production d'éthylène dans le sol (126), il nous a donc semblé intéressant d'utiliser un gaz produit naturellement par ce champignon.

A.- INFLUENCE DE L'ANAEROBIOSE SUR LA CAROTENOGENESE

1) Composition en caroténoïdes

L'extraction et la séparation des polyènes selon les techniques habituelles, montrent que M.hiemalis ne synthétise en anaérobiose que du phytoène. Nous avons également recherché si en absence d'oxygène, la fluorénone conserve son pouvoir d'augmenter la synthèse du phytoène-trans et le tableau 11 résume les résultats obtenus.

TABLEAU 11

Comparaison de la composition en caroténoïdes de Mucor hiemalis cultivé à la lumière du jour soit en anaérobiose, soit en aérobiose.

Phase azeuse	durée (jours)	Phytoène 15-cis	Phytoène 13-cis	Phytoène all-trans	Phytoène total	A
	4	89	0	10	99	10,1
$\text{C}_{22}=\text{CH}_2$	5	78	0	4	82	4,8
	4	32,3	0	1,2	33,5	3,7
fluorénone	6	54,1	24,5	46,5	125,5	37,1
$\text{C}_{22}=\text{CH}_2$	6	36,3	14,3	16,2	66,8	24,2
fluorénone	5	36,2	17,8	16,5	70,5	23,4
fluorénone						
anaérobiose	4	435	0	0	435	0
anaérobiose + fluorénone	4	658	416	2090	3164	66

Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/g}$ de matière sèche.

$$A = \% \frac{\text{Phytoène-all-trans}}{\text{Phytoène total}}$$

De l'examen du tableau 11, il ressort que l'anaérobiose entraîne une inhibition des désaturations du phytoène et de plus ralentit aussi très fortement la synthèse de celui-ci. La majeure partie du phytoène est de configuration *cis* mais nous avons pu également mettre en évidence, dans toutes les cultures, du phytoène-*all-trans*. Lorsque les cultures sont faites en présence de fluorénone, le taux de cet isomère est légèrement augmenté mais reste incomparablement plus faible que celui obtenu en aérobie.

Dans une autre série d'expériences, le mycélium d'une culture anaérobie de 4 jours est remis en suspension dans un tampon phosphate M/15 additionné ou non de glucose à 5% puis énergiquement aéré par un barbotage d'air. Rapidement, le mycélium prend une teinte légèrement jaune par suite de la formation essentiellement de β -carotène. L'oxygène est donc indispensable pour la caroténogenèse de *M. hiemalis*, mais il subsiste néanmoins une ambiguïté quant à l'origine du β -carotène synthétisé. En effet, la quantité de phytoène reste voisine de celle observée au début de l'expérience et le β -carotène peut donc provenir soit du phytoène accumulé durant l'anaérobiose soit du phytoène synthétisé de novo.

2) Recherche du lycopersène

La synthèse du phytoène étant fortement diminuée en anaérobiose, ceci nous a amenés à envisager dans ces conditions une accumulation éventuelle de précurseurs en C_{40} comme le lycopersène.

L'insaponifiable des cultures effectuées en anaérobiose est chromatographié sur colonne d'alumine alcaline Woelm d'activité I. Les fractions s'éluant avant le phytoène sont recueillies et chromatographiées ensuite sur plaque de gel de silice G imprégnée de fluorescéine et développée dans l'éther de pétrole sans benzène. La mise en évidence des composés

insaturés est obtenue par exposition des plaques aux vapeurs de brome et des taches jaunes très fortement fluorescentes apparaissent sur fond rose. Ce système de chromatographie permet une bonne séparation du phytoène (Rf 0,23), du lycopersène (Rf 0,44) et du squalène (Rf 0,62). La fraction, qui s'élue avec 1,5% d'éther sulfurique dans l'éther de pétrole, juste avant le phytoène-15-cis, fournit un composé qui donne sur chromatoplaque une tache possédant un Rf voisin de celui du lycopersène témoin. Le spectre ultraviolet de ce produit rappelle cependant celui du phytoène. La spectrométrie de masse révèle qu'il s'agit en fait d'un mélange comprenant une faible quantité de squalène caractérisé par des pics à m/e 410 (M), 341 (M-69) et 204 (M-137) et de déhydrosqualène, pics à m/e 408 (M), 314 (M-94) et 271 (M-137). Le spectre ne présente en revanche aucun pic de masse plus élevée, ce qui montre l'absence probable de lycopersène.

Ce résultat négatif est donc à rapprocher de ceux obtenus avec d'autres champignons tels que Phycomyces blakesleeanus (127), Neurospora crassa (25) ou de bactéries du genre Mycobacterium (63). La formation de lycopersène à partir de pyrophosphate de géranylgéranyle par un extrait acellulaire de N.crassa a cependant été rapportée (24) mais ce résultat pourrait s'expliquer par un manque de spécificité de la squalène synthétase. En effet, il vient d'être montré récemment que celle-ci peut accepter comme substrat aussi bien le pyrophosphate de farnésyle que le pyrophosphate de géranylgéranyle (23).

De la même façon, on pourrait envisager que la lycopersène déshydrogénase ne possède pas de spécificité absolue et peut, dans certains cas, désaturer le squalène en déhydrosqualène. Ce dernier pourrait alors être considéré comme étant l'homologue inférieur du phytoène mais on n'a pas encore signalé de caroténoïde en C₃₀ ne provenant pas d'une dégradation de squelette normal. En revanche, un rôle de précurseur des

caroténoïdes en C₄₀ et principalement du ζ -carotène a déjà été attribué au déhydroqualène chez un mutant de Staphylococcus aureus (128). Cependant, bien que ce composé ait été récemment isolé d'Halobacterium cutirubrum (129), ce rôle n'a pas été confirmé.

B.- INFLUENCE DE L'ANAEROBIOSE SUR LA SYNTHÈSE DE DIVERS COMPOSÉS LIPIDIQUES.

Nous avons tout d'abord séparé les lipides par classes puis isolé les stérols et les acides gras.

1) Stérols

Alors que dans les cultures aérobies, la teneur en stérides atteint 15 à 20% de la quantité totale des lipides, elle s'avère être nulle dans tous les essais que nous avons réalisés en anaérobiose. La quantité de stérols libres varie suivant la durée des cultures entre 1 mg et 3 mg/g de matière sèche ce qui représente une concentration 5 à 10 fois plus faible que celle rencontrée dans le mycélium qui s'est développé en présence d'oxygène.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse de la fraction la moins polaire de l'insaponifiable montre en fait que le précurseur des stérols s'accumule au cours de l'anaérobiose. En effet, la quantité de squalène mise en évidence dans ces conditions est 5 à 6 fois supérieure à celle obtenue dans les cultures normales. Des résultats similaires ont déjà été obtenus chez Mucor genevensis (123) et Saccharomyces cerevisiae (130).

Il faut toutefois remarquer que dans les conditions normales, la teneur en stérols avoisine 15 à 20 mg/g de matière sèche et l'on aurait donc pu s'attendre à l'accumulation d'une quantité équivalente de squalène en absence d'oxygène. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour rendre compte de ce fait mais la possibilité d'un rétrocontrôle exercé par le squalène sur sa propre synthèse paraît d'autant plus probable que ce composé est connu pour présenter une certaine toxicité (131). Ce rétrocontrôle cesse dès que cesse l'anaérobiose. Lorsque le mycélium provenant d'une culture anaérobique est soumis à une aération en tampon phosphate, les stérols se synthétisent en effet rapidement et leur taux au bout de quelques heures n'est plus que légèrement inférieur à celui d'une culture réalisée d'emblée en aérobiose. Ceci montre donc qu'une synthèse importante de squalène, par rapport à la quantité préalablement accumulée, a lieu sous l'influence de l'oxygène.

2) Acides gras

L'anaérobiose influence de façon sensible également la synthèse des lipides totaux de M.hiemaleis. En effet, la quantité totale des lipides pour une culture de 5 jours en aérobiose est égale à 295 mg/g, en anaérobiose elle ne représente plus que 125 mg/g, le milieu étant cependant dans ce dernier cas enrichi en extrait de levure.

Les résultats concernant la composition en acides gras de M.hiemaleis cultivé dans différentes conditions d'anaérobiose sont rassemblés dans le tableau 12 et montrent que c'est sans conteste la synthèse des acides gras insaturés qui est la plus affectée. Les acides polyinsaturés en C₁₈ sont en effet absents et la teneur en acide oléique qui représente environ 40% en aérobiose, ne dépasse pas ici 5%. Bien que faible, cette synthèse d'acide oléique qui nécessite habituellement chez les champignons la présence d'oxygène moléculaire

(132), témoigne donc de l'existence chez M.hiemalis d'un processus probablement voisin sinon identique à celui mis en évidence chez les microorganismes anaérobies (133).

En ce qui concerne les acides saturés, on constate que la proportion d'acide stéarique est plus élevée qu'en aérobiose mais c'est cependant la synthèse des acides gras à courte chaîne (acides caprique, laurique, myristique) qui subit la plus forte augmentation. On note en effet, que ces acides représentent à eux seuls 60% de la quantité totale des acides gras au lieu de 2% en aérobiose. Des résultats assez semblables ont été obtenus chez Mucor genevensis (123) et Saccharomyces cerevisiae (130) cultivés dans les mêmes conditions.

L'addition de fluorénone aux cultures ne modifie pas sensiblement l'effet de l'anaérobiose sur la synthèse des acides gras et la seule particularité qui mérite d'être signalée consiste en une légère diminution en acide palmitique.

TABLEAU 12

Composition en acides gras de Mucor hiemalis cultivé en anaérobiose en absence et en présence de fluorénone.

des s	N ₂	CH ₂ =CH ₂	H ₂	N ₂ + fluorénone	CH ₂ =CH ₂ + fluorénone	H ₂ + fluorénone
	9,2	6,9	traces	traces	traces	traces
	13,8	13,9	13,8	20,6	16,9	22,2
	0	traces	traces	traces	0,3	1,0
	18,4	27,7	19,5	21,6	26,7	26,3
	traces	traces	traces	traces	0,5	0,8
	16,9	15,1	18,0	19,6	12,5	12,9
tifié	0	0	0	0	0,9	1,2
	traces	0,7	traces	traces	traces	0
	21,7	19,2	18,9	13,0	13,5	10,6
	1,8	1,2	2,6	1,4	2,2	1,9
	0	traces	0	0	traces	0
	0	0	traces	0	1,4	1,2
	13,1	13,1	15,1	16,6	15,2	11,8
	4,7	2,1	4,8	2,5	6,3	6,6
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	traces	traces	7,2	4,6	3,3	3,2
rés	93,1	96,6	92,5	96,0	89,8	90,0
aturés	6,5	3,3	7,4	3,9	9,9	9,7

es résultats sont exprimés en % des acides gras totaux.

L'admission d'oxygène dans les cultures, provoque, en revanche, un changement rapide et spectaculaire de la composition en acides gras. Signalons qu'afin d'éviter toute synthèse à partir du glucose restant dans le milieu de culture, nos essais concernant l'influence de l'oxygène ont été réalisés en tampon phosphate. Après quelques heures d'incubation dans ces conditions, on constate une chute importante de la teneur en acides gras à courte chaîne suivie d'une augmentation concomitante de celle en acides insaturés. Au bout de 24 heures, les acides linoléique et linolénique, en particulier, absents en anaérobiose, atteignent des taux représentant respectivement 10,3 et 12,9 % des acides gras totaux.

Ce résultat confirme donc bien, comme cela a déjà été signalé chez différents microorganismes (134) que l'oxygène moléculaire est indispensable à la synthèse des acides gras polyinsaturés. Il faut toutefois souligner que si le taux de ces derniers revient sensiblement à la normale après admission d'oxygène dans les cultures, la teneur en acide oléique (18,8% reste en revanche inférieure à celle des cultures aérobies (40,6 %). Inversement, le taux d'acide stéarique (13,8 %) est plus élevé qu'en présence d'oxygène (1 %) et montre donc que le mécanisme de la désaturation en acide oléique n'a pas été entièrement rétabli par le passage en aérobiose.

C.- INFLUENCE DE L'ANAEROBIOSE SUR LA MORPHOLOGIE

Quelques Mucorales se transforment en éléments levuriformes doués de propriétés fermentatives lorsqu'elles sont placées dans un milieu dépourvu d'oxygène. Le passage de la forme mycélienne M à la forme levure L a été découvert par BAILLIE chez un Mucor, il y a plus d'un siècle (135). Cette observation a été confirmée ensuite par PASTEUR avec Aspergillus glaucus et Penicillium glaucum et interprétée comme étant le résultat de la raréfaction en oxygène des cultures (136).

Lorsque notre souche est cultivée en anaérobiose, le mycélium se présente sous forme de filaments qui se terminent souvent par des chaînettes d'arthrospores (Pl.1, fig.5). Parmi ces filaments, certains sont très vacuolisés, en particulier dans le cas des cultures effectuées sous hydrogène ou sous éthylène, mais aucune forme levure n'est observée dans ces conditions.

L'examen en microscopie électronique de coupes transversales de ces filaments montre que tout au moins dans la zone subapicale, l'épaisseur de la paroi (0,28) ne semble pas particulièrement modifiée par l'anaérobiose (Pl.II, fig. 11). Les noyaux sont entourés d'une membrane nucléaire bien conservée, montrant de nombreux pores et le réticulum endoplasmique semble curieusement diviser le cytoplasme en deux zones. Si certaines mitochondries sont globuleuses et possèdent des crêtes individualisées et parallèles entre elles, quelques-unes semblent en être dépourvues.

L'adaptation de M.hiemalis à la vie fermentaire n'entraîne donc pas apparemment de modification très importante de l'architecture mitochondriale comme cela a été observé chez Saccharomyces cerevisiae cultivé en absence d'ergostérol (137). Des mutants de Neurospora crassa capables de pousser en anaérobiose possèdent également des mitochondries dont certaines apparaissent gonflées et présentent quelques crêtes, d'autres plus rudimentaires sont réduites à une double enveloppe (138). Il n'est toutefois pas exclu que les anomalies constatées représentent en fait des artéfacts dus en particulier à la fixation des échantillons. Ceci semble d'ailleurs confirmé par le fait que la technique de cryodécapage a permis de mettre en évidence chez S.cerevisiae cultivé ou non en présence d'ergostérol, des mitochondries présentant des crêtes et une enveloppe parfaitement normales (139).

Sous azote et en présence de fluorénone, la croissance de M.hiemalis a lieu presque exclusivement sous forme d'éléments arrondis qui se multiplient par bourgeonnement multipolaire (Pl.I, fig.3). Des cultures sur lames gélosées, nous ont permis de suivre la naissance de ces formes levures à partir du mycélium. On assiste tout d'abord à la formation de chaînettes d'arthrospores, qui débute par une série de constriction de l'hyphe, ébauches de futures spores qui s'individualisent par élaboration de cloisons transversales. Signalons en passant que nous avons observé également la formation intrahyphale d'arthrospores (Pl.I, fig.5).

Les formes levures se distinguent des arthrospores provenant de la désarticulation d'hyphes par leur mode de reproduction et, selon BARNICKI-GARCIA une cellule particulière de forme arrondie serait le terme commun entre les différents modes de différenciation de M.rouxii (140). De même chez Phialophora dermatitidis une cellule à paroi épaisse sert d'intermédiaire entre la forme levure vraie et la forme mycélienne (141).

Nous n'avons pas rencontré chez M.hiemalis de telle cellule intermédiaire mais en revanche, que les arthrospores soient ou non séparées les unes des autres, des bourgeons apparaissent à leur surface (Pl.I, fig.6) donnant ainsi naissance aux cellules levuriformes. Ce mode de formation n'est pas cependant exclusif et nous avons même observé des bourgeons se formant latéralement sur les hyphes.

Les coupes pratiquées sur les formes L de M.hiemalis montrent que ces cellules sont multinucléées et les mitochondries, relativement nombreuses, présentent des crêtes parfaitement normales (Pl.III, fig.13). Le réticulum endoplasmique est peu développé et le système vacuolaire plus ou moins abondant renferme de nombreuses inclusions paracrystallines mais l'élément le plus remarquable de ces cellules est certainement la paroi. Comme chez Mucor rouxii (140), celle-ci

présente en effet une épaisseur qui est considérablement augmentée par rapport à celle de la forme mycélienne et atteint dans certains cas jusqu'à 1 μ .

Au début du bourgeonnement, la couche externe de la paroi se déchire puis forme ensuite autour du bourgeon une collerette analogue à celle décrite chez Phialophora dermatitidis (141). La couche la plus externe de la paroi du bourgeon tire apparemment son origine de la partie la plus interne de la paroi de la cellule parentale (Pl. III, fig.4) mais ceci semble moins évident après qu'un épaissement des parois soit intervenu (Pl.III, fig.13). La séparation des cellules s'effectue après la création d'un septum à laquelle participent peut-être les vésicules provenant du réticulum endoplasmique (142) et situées à ce niveau (Pl.III, fig.14). Les figures 13 et 15 montrent la formation de la zone d'abscission et l'amorce de rupture des parois au moment du départ de la cellule fille.

Ce mode de bourgeonnement qui n'a pas encore été signalé chez les Phycomycètes serait donc à rapprocher de celui décrit chez les levures comme Sterigmatomyces, apparentées aux Basidiomycètes (143).

L'adaptation de M.hiemalis à des conditions de vie assez défavorables et qui se traduit par la substitution d'une croissance isodiamétrique à la croissance apicale caractéristique des champignons, n'entraîne pas l'irréversibilité de ce phénomène. En effet, lorsque les formes L sont mises en aérobiose dans un tampon phosphate M/15, elles émettent en quelques heures un ou plusieurs tubes germinatifs et se colorent (Pl.I, fig. 4). Ce processus se déroule encore plus rapidement dans un tampon additionné de glucose comme cela a été rapporté pour M. genevensis (144).

Ainsi que le montre la figure 16 (Pl.III), la paroi du tube germinatif comme celle du bourgeon, dérive de la couche interne de la paroi de la cellule mère. La présence de nombreuses mitochondries et d'un réticulum endoplasmique abondant le long du plasmalemma, témoigne d'une activité métabolique intense mais nous n'avons pas observé la formation de systèmes membranaires intracytoplasmiques de type lomasome comme cela a été signalé chez Blastomyces dermatitidis et Histoplasma capsulatum (145). De plus, bien que nous n'ayons pas noté la présence systématique de cloison à la base du tube germinatif, la figure 17 (Pl. III) montre l'existence d'un septum simple, consistant en une zone transparente comprise entre deux couches denses aux électrons bordées d'éléments du réticulum endoplasmique. Chez les Phycomycètes, seule la formation de septa entre le gamétange et le suspenseur a été particulièrement bien étudiée et se ferait par incorporation de vésicules coalescentes et alignées dans le sens de la croissance du septum (146). Par ailleurs, nous avons occasionnellement remarqué à proximité du septum, la présence de corps opaques aux électrons qui ne présentent aucune substructure particulière (Pl.III, fig.18). Nous pensons que ces inclusions sont à rapprocher des corps de Woronin qui ont été mis en évidence au niveau des septa chez les Ascomycètes (147) et également lors de la germination des formes L de champignons pathogènes (148). A notre connaissance leur présence chez les Phycomycètes n'a pas encore été mentionnée.

Les cultures de M.hiemalis en anaérobiose et en présence d'autres inhibiteurs de la caroténogénèse que la fluorénone, permettent d'obtenir des formes levures mais la croissance hyphale reste, dans tous les cas, prédominante.

Nous n'avons pour l'instant aucune hypothèse satisfaisante pour expliquer la spécificité apparente de la fluorénone dans l'induction des formes levures. Si la raréfaction de l'oxygène a été invoquée dans de nombreux cas pour expliquer

le dimorphisme de certaines Mucorales, l'anhydride carbonique s'est révélé actif dans le cas de Mucor quillermondii (140) et Mucor rouxii, mais n'est cependant pas nécessaire pour Mucor subtilissimus (139). Des formes L ont été obtenues lorsque M.rouxii est cultivé en aérobiose en présence d'alcool phényléthylque (150) et plus récemment des formes L ont été induites, également en aérobiose, chez diverses espèces de Mucor cultivées en présence d'antibiotiques ou de fongicides (151).

Dans tous les cas, l'épaississement très important de la paroi des levures par rapport à celle des hyphes, constitue un caractère particulier de ce type de dimorphisme. Il serait dû chez M.rouxii à une modification de la teneur en protéines et en mannanes (152) alors que chez Blastomyces dermatitidis, le même phénomène aurait pour origine des variations dans la stéréochimie des liaisons osidiques. En effet, dans les parois des formes L, 95 % des glucanes seraient de configuration α alors que dans les formes M (153) 40 % seraient de configuration β . La rupture des ponts disulfure a été à plusieurs reprises également invoquée pour expliquer la diminution de rigidité des parois et l'obtention de cellules levuriformes chez des champignons dimorphiques. La forme M de Paracoccidioides brasiliensis, par exemple, contient 12 fois plus de liaisons -S-S- que la forme L qui présente en revanche, une activité réductasique des ponts disulfure très supérieure à celle de la forme M (154). La forme pseudomycélienne de Candida albicans serait alors, selon certains auteurs, le résultat de l'inhibition sélective de la protéine disulfure réductase (141).

Des études d'autoradiographie après marquage à la N-acétyl-D-glucosamine tritiée, confirment chez M.rouxii que la paroi de l'hyphe est préférentiellement synthétisée dans la région apicale alors que pour les formes levures, la formation de la paroi se fait de façon uniforme sur toute la périphérie de la cellule (155).



CHAPITRE VI

LOCALISATION DES CAROTENOIDES CHEZ MUCOR HIEMALIS



Les caroténoïdes se rencontrent à l'état naturel soit sous forme liée, soit sous forme libre et l'on distingue les caroténo-protéines vraies qui sont des composés dans lesquels les protéines et les pigments sont liés en proportions stoechiométriques et les lipoprotéines qui contiennent des pigments apparemment en simple solution dans la partie lipidique (156).

En ce qui concerne la localisation proprement dite des caroténoïdes, SCHOPFER avait déjà signalé en 1928 que chez certains champignons le β -carotène est concentré dans les globules lipidiques. Il avait de plus noté que ce pigment se présente parfois sous forme de cristaux au sein du mycélium (157). Selon une hypothèse avancée par HEIM, les caroténoïdes se synthétiseraient d'abord dans les mitochondries avant de s'accumuler, soit à l'état dissous dans les globules lipidiques, soit sous forme d'aiguilles cristallines dans le cytoplasme (158). Le lycopène a effectivement été observé sous forme d'inclusions cristallines chez Anthurus aseroiformis (159). Les pigments de Ciliaria hirta seraient au contraire élaborés dans les saccules du réticulum endoplasmique puis quitteraient ces saccules pour se fixer, au fur et à mesure du vieillissement de la cellule, dans les gouttelettes lipidiques (160). Une localisation toute différente aurait été mise en évidence chez Dacryopinax spathularia (161). En effet, d'après la réaction de CARR et PRICE, les caroténoïdes se trouveraient fixés dans la paroi et ce résultat serait confirmé après broyage du champignon et centrifugation différentielle.

A.- RECHERCHE DES DIFFERENTS SITES D'ACCUMULATION DES
CAROTENOIDES CHEZ MUCOR HIEMALIS

Après broyage du champignon dans du tampon phosphate à pH 7,2 contenant du saccharose 0,5 M, une première centrifugation à 1500 g pendant 10 mn permet d'éliminer les hyphes non broyés ainsi que les gros débris cellulaires et les parois. Une seconde centrifugation à 8000 g pendant 10 mn fournit un culot contenant principalement les mitochondries, tandis qu'une troisième, effectuée sur le surnageant à 176000 g pendant 60 mn sépare une fine couche huileuse qui flotte à la surface d'un liquide légèrement teinté en jaune.

La fraction mitochondriale également jaune est purifiée par centrifugations répétées sur gradient de saccharose mais malgré ce traitement, la microscopie électronique révèle la présence de fins globules lipidiques et l'étude de cette fraction est abandonnée. Il a cependant été signalé que les mitochondries de Neurospora crassa et en particulier leur membrane externe présente un spectre d'absorption correspondant à la neurosporaxanthine (162).

Le surnageant contenant les protéines solubles possède une coloration jaune d'intensité variable suivant les expériences et de plus, la quantité de pigments étant extrêmement faible, nous n'avons pas tenté de poursuivre plus avant nos investigations.

En revanche, la couche huileuse intensément colorée est purifiée deux fois par remise en suspension dans du tampon puis séparée à nouveau chaque fois par centrifugation. Comme elle contient apparemment la presque totalité des pigments, c'est donc à cette fraction uniquement formée de globules lipidiques que nous avons limité notre étude.

B.- ETUDE DES GLOBULES LIPIDIQUES

1) Morphologie

A notre connaissance, c'est surtout dans le cas des levures et en particulier chez Saccharomyces cerevisiae que les inclusions lipidiques ont été tout d'abord étudiées par microscopie électronique. Par cryodécapage, elles se présentent sous forme de granules sphériques liés par une membrane et renferment un contenu soit amorphe, soit lamellaire suivant la proportion de lipides polaires et apolaires (163). Selon certains auteurs, les sphérosomes des plantes supérieures seraient entourés d'une couche monomoléculaire de phospholipides sur laquelle seraient adsorbées des protéines. Cependant l'analyse aussi bien biochimique qu'immunologique prouve toutefois, que les protéines isolées des sphérosomes ont la même composition que celles provenant de membranes typiques. De plus, la délipidation partielle des sphérosomes permet d'obtenir des images parfaitement identiques à celles de membranes tripartites et la couche externe des globules lipidiques devrait donc être assimilée à une véritable " demi-unité membranaire " (164).

Les globules lipidiques que nous avons isolés de M.hiemalis se présentent après purification sous forme de particules arrondies de taille variable (0,2 à 1,8 μ) et entourées de façon discontinue par une couche mince, granuleuse et plus osmophile que la partie centrale (Pl.II, fig.8). Des fragments de double membrane sont parfois visibles à la surface des globules et pourraient représenter des vestiges de connections avec le réticulum endoplasmique. Nous ne pouvons pas exclure cependant pour l'instant une origine purement artificielle et due, par exemple, à un réarrangement de fragments de " demi-unités membranaires ".

2) Spectre d'absorption

Des variations plus ou moins importantes des spectres d'absorption des caroténoïdes sont enregistrées lorsque l'environnement de ces pigments se trouve modifié ou lorsqu'ils sont engagés dans des liaisons, par exemple avec des protéines (165). Le spectre des globules lipidiques isolés de cultures normales de M.hiemalis présente une grande similitude avec celui du β -carotène en solution dans l'éther de pétrole et ne s'en distingue que par un déplacement bathochrome de 10 nm environ. Un phénomène analogue a également été noté pour le spectre des gouttelettes huileuses isolées par centrifugation du sporangiophore de Phycomyces (166). Il n'est cependant pas évident qu'un déplacement aussi faible puisse résulter d'une liaison particulière des pigments au sein des globules. En effet, le β -carotène associé aux protéines lamellaires des chloroplastes (165) donne un spectre dont les maxima accusent un déplacement à peu près deux fois plus important que celui que nous enregistrons pour Mucor hiemalis. Nous avons de plus constaté que si l'on incorpore du β -carotène synthétique à des globules lipidiques incolores provenant de cultures inhibées par la fluorénone, le spectre d'absorption de ceux-ci est en tout point superposable à celui des globules normalement colorés. Nous avons noté en particulier un déplacement de 10 nm des maxima d'absorption par rapport à ceux du spectre de référence du β -carotène dans l'éther de pétrole. Ceci tend donc à démontrer que les caroténoïdes sont en simple solution dans les lipides, mais il existe toutefois une différence très importante en ce qui concerne l'extractibilité du β -carotène surajouté et des pigments normalement présents dans les globules lipidiques.

3) Extractibilité des pigments

Si le β -carotène incorporé artificiellement aux globules lipidiques s'extraît d'emblée et totalement par traitement à l'éther de pétrole, ce solvant n'entraîne au contraire qu'une décoloration graduelle et incomplète des globules normaux. On peut donc envisager dans ce dernier cas qu'il s'agit d'un phénomène dû à la dénaturation progressive d'une liaison assez lâche dans laquelle les pigments se trouveraient engagés. Si l'on ajoute à l'éther de pétrole des quantités croissantes d'acétone ou d'alcool, la vitesse de dénaturation croît très rapidement et corrélativement la quantité de caroténoïdes extraite. Une hétérogénéité de liaison accompagnée d'ailleurs d'une hétérogénéité métabolique a été également mise en évidence dans le cas des caroténoïdes des chloroplastes de feuilles de blé (167) et d'épinard (165).

L'analyse des extraits éthéro-pétroliques des globules lipidiques montre cependant qu'il ne s'opère pas d'extraction sélective des pigments au cours des traitements successifs et que tous les caroténoïdes caractérisés dans la culture initiale sont présents dans chaque extrait. Il semble donc que la liaison dans laquelle les pigments seraient engagés ne soit pas sensible aux différences de structure moléculaire et d'ailleurs le phytoène des globules provenant de cultures inhibées par la fluorénone présente les mêmes caractères d'extractibilité que ceux que nous venons d'exposer pour les caroténoïdes des cultures normales.

4) Composition chimique

Par analogie avec les chylomicrons (168) dont les clichés de microscopie électronique rappellent ceux que nous avons obtenus pour les globules lipidiques, on peut imaginer ces derniers comme étant formés d'une partie centrale composée de stérides en solution dans les triglycérides et limitée par une membrane formée de protéines et de phospholipides dont les groupements polaires seraient orientés vers l'extérieur.

A partir de cultures normales âgées de 6 jours et donc en phase stationnaire de croissance, les globules lipidiques ont une composition relativement constante. Les glycérides, surtout formés de triglycérides, représentent en moyenne 85 %, les stérides 10 % alors que les phospholipides et les protéines ne dépassent pas 1,5 et 4% respectivement. Une teneur voisine en phospholipides et protéines a été signalée dans les sphérosomes isolés de tissus de plantes supérieures (169). De plus, dans aucun des essais réalisés nous n'avons pu détecter d'ergostérol sous forme libre comme dans les lipides totaux et ceci tend à confirmer que, sous cette forme, les stérols sont plutôt des constituants des membranes. La composition en acides gras reflète celle en lipides totaux avec une proportion d'acides insaturés très élevée (70%) parmi lesquels dominent l'acide oléique (26%), l'acide linoléique (16%) et l'acide γ -linolénique (16%). Parmi les acides gras saturés, citons l'acide palmitique (23%), l'acide stéarique (3%) et l'acide myristique (2%). En aucun cas nous n'avons observé d'accumulation préférentielle d'acide γ -linolénique. Signalons de plus que si nous n'avons pas rencontré d'acides gras libres, nous avons en revanche isolé de faibles quantités d'esters méthyliques comme chez Rhizopus arrhizus (170).

Les globules lipidiques isolés de cultures inhibées possèdent une composition en triglycérides, stérides, phospholipides voisine de celle que nous venons de décrire ; seule la composition en acides gras reflète les différences que nous avons déjà soulignées à propos des lipides totaux. Après extraction des globules lipidiques par la méthode de FOLCH, les protéines ont été hydrolysées en tube scellé par de l'acide chlorhydrique et les acides aminés ont été séparés à l'aide d'un analyseur automatique (Technicon); les résultats sont rassemblés dans le tableau 13.

A l'examen de ce tableau, on s'aperçoit que les protéines isolées sont particulièrement riches en acide aspartique (12,7 %), en acide glutamique (13,9 %) et que la teneur en acides aminés polaires (60,3 %) est nettement plus élevée que celle en acides aminés non polaires. Cette composition se rapproche de celle des membranes sphérosomales des tissus cotylédonaire d'Arachis hypogaea (169) ainsi que de celle des membranes mitochondriales de Neurospora crassa (171).

TABLEAU 13

Comparaison de la composition en acides aminés de globules lipidiques et de protéines mitochondriales.

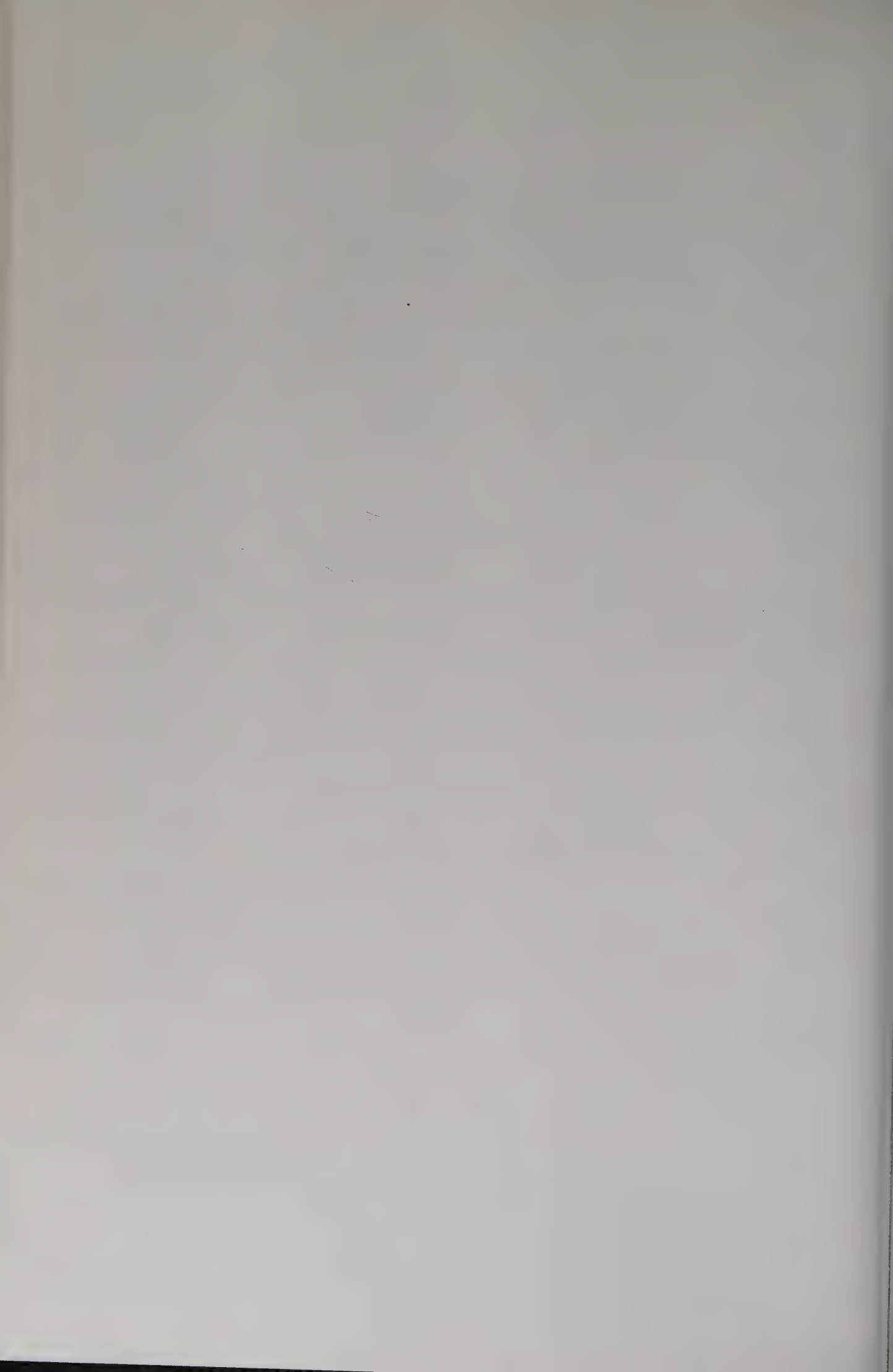
Acide aminé	<u>Mucor hiemalis</u> (1)	<u>N.crassa</u> (1)	Arachides (2)
	(sphérosomes)	(mitochondries)	(sphérosomes)
Lysine	8,4	6,4	4,0
Histidine	3,4	2,3	1,6
Arginine	4,5	5,4	4,1
Acide aspartique	12,1	9,0	7,5
Thréonine	4,7	5,4	8,6
Sérine	5,6	5,9	8,6
Acide glutamique	13,0	10,1	8,3
Proline	0	4,2	4,1
Glycine	10,9	8,7	14,1
Alanine	10,0	10,3	11,0
Valine	2,2	7,2	5,6
Méthionine	1,7	2,1	0,4
Isoleucine	2,3	5,4	4,3
Leucine	8,1	8,7	9,2
Tyrosine	3,5	2,8	4,6
Phénylalanine	4,5	3,9	4,0
$\frac{1}{2}$ Cystine	3,1	1,8	-
Non déterminé	1,9	-	-

Les résultats sont exprimés en % des acides aminés.

1 - calculé à partir des résultats de WOODWARD et MUNKRES (171).

2 - résultats de YATSU et JACKS (169).

Cette constatation représente, nous semble-t-il, un argument important pour assimiler également la couche externe des globules de M.hiemalis à une " demi-unité membranaire ". La composition et la morphologie de celle-ci ne semblent pas modifiées dans le cas des cultures effectuées en présence d'inhibiteur de la caroténogénèse bien qu'au cours de cette étude nous ayons caractérisé à différentes reprises de la fluorénone dans les globules lipidiques. La présence de cet inhibiteur pourrait d'ailleurs expliquer en partie les difficultés que nous avons rencontrées pour rétablir une caroténogénèse complète dans les essais de levée d'inhibition. Toutefois, le fait qu'au cours de ceux-ci, les globules lipidiques qui contiennent la presque totalité du phytoène de la cellule, se colorent, montre que les enzymes responsables des désaturations auraient accès aux globules ou qu'ils feraient peut-être partie intégrante de ceux-ci. Signalons à ce propos que des études réalisées avec différents mutants de Neurospora crassa conduisent à penser que les caroténoïdes seraient synthétisés par un complexe multienzymatique induit par la lumière (172). Une étude approfondie de la membrane des sphérosomes paraît donc être d'une grande importance dans l'étude de la caroténogénèse et semble de ce fait devoir dépasser largement le cadre de la morphologie.



ABREVIATIONS

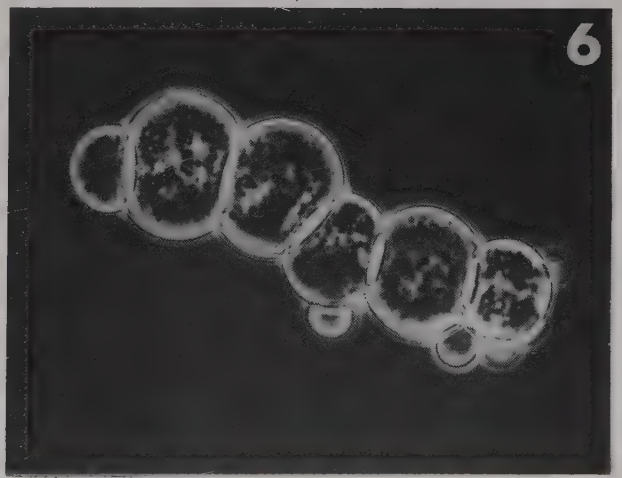
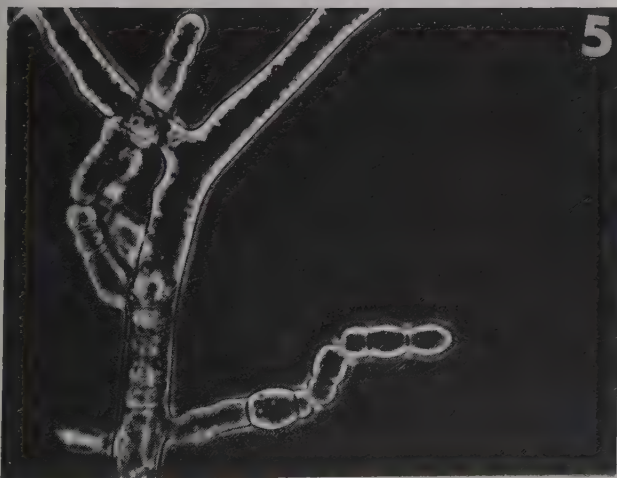
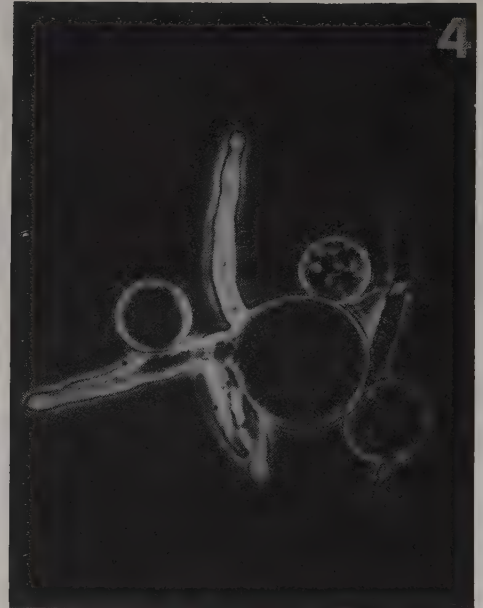
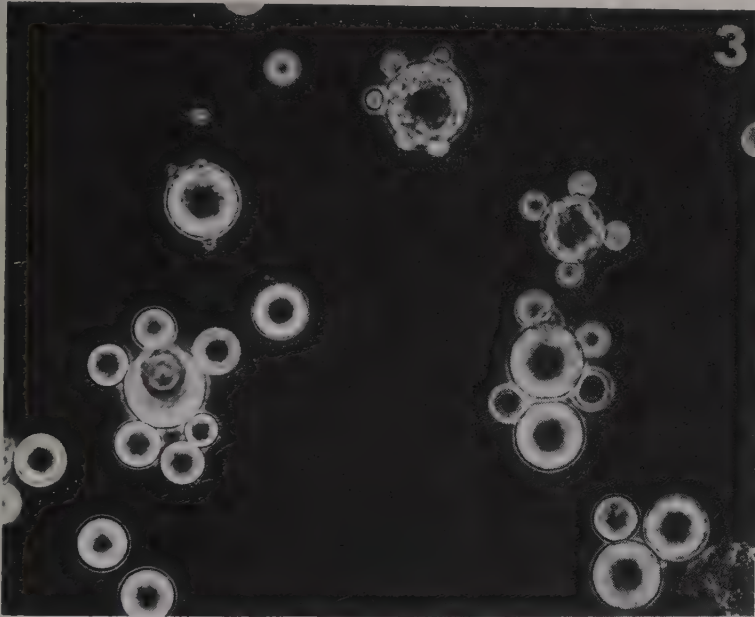
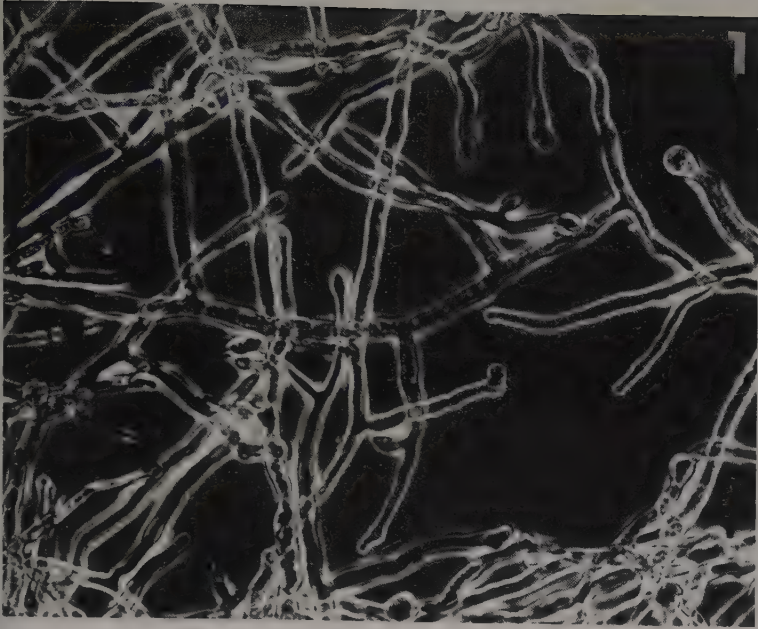
gl	globule lipidique
n	noyau
m	mitochondrie
p	paroi
s	septum
v.a	vacuole
v.e	vésicule cytoplasmique
c.w	corps de Woronin

PLANCHE I

Dimorphisme de Mucor hiemalis

(microscopie en contraste de phase)

- 1 - Extrémités apicales d'hyphes. Aérobiose - 48 h. x 350.
- 2 - Globules lipidiques . Aérobiose - 48 h. x 450.
- 3 - Formes levures de M.hiemalis
Anaérobiose en présence de 9-fluorénone - 48 h. x 500.
- 4 - Germination de formes levures en aérobiose - 4 h. x 800.
- 5 - Chaînes d'arthrospores intrahyphales. Anaérobiose -
4 jours. x 800.
- 6 - Bourgeonnement d'arthrospores
Anaérobiose en présence de 9-fluorénone - 48 h. x 900.





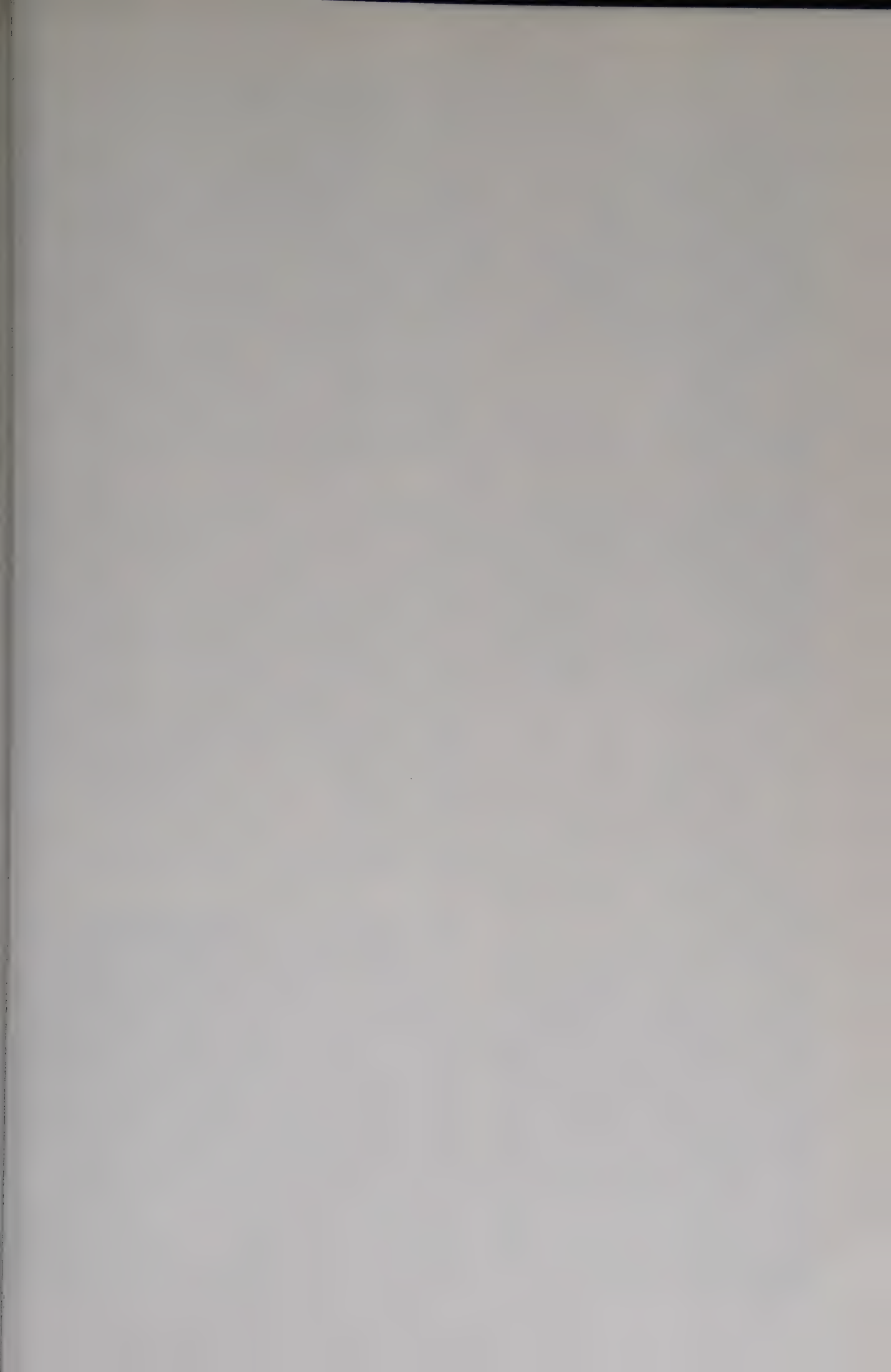
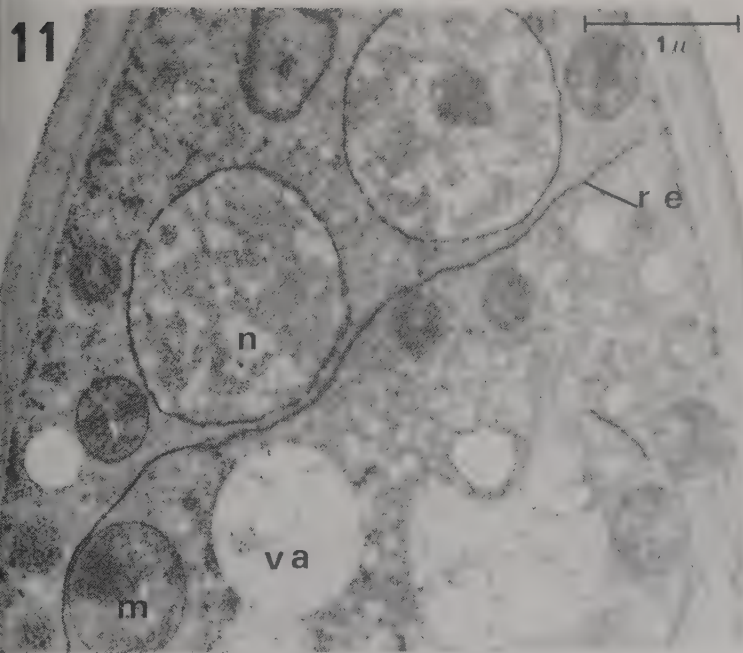
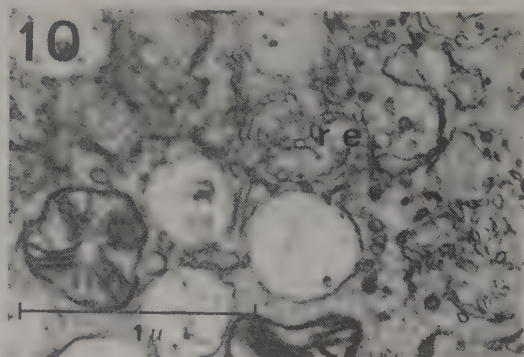
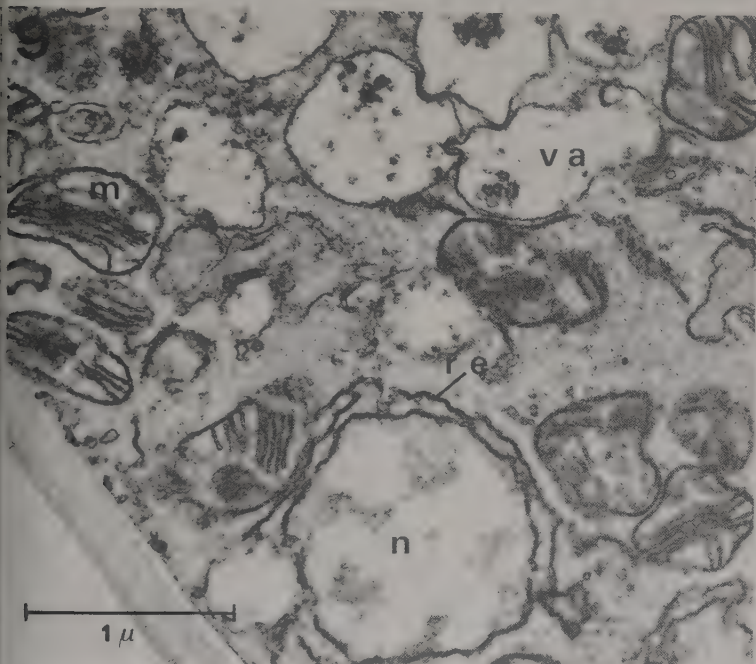
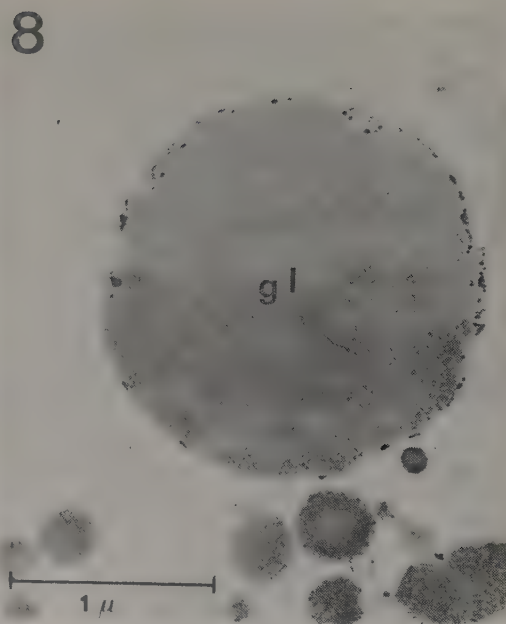
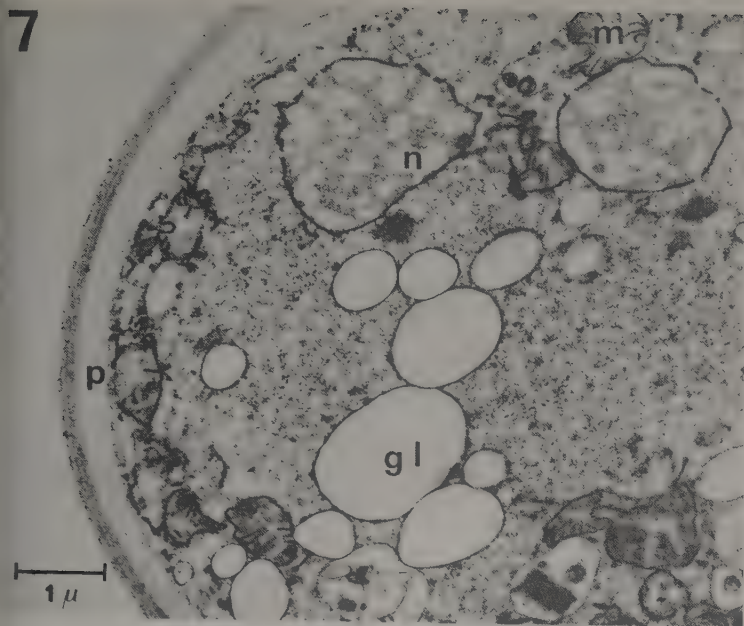


PLANCHE II

Forme filamenteuse de Mucor hiemalis

- 7 - Coupe transversale d'hyphe provenant de culture normale.
Aérobiose - 48 h. KMnO_4 . x 12000.
- 8 - Coupe de globule lipidique isolé.
Acide osmique. x 27300.
- 9 - Coupe transversale d'hyphe provenant de culture normale.
Aérobiose - 48 h. KMnO_4 . x 27300.
- 10 - Détail d'éléments du réticulum endoplasmique.
 KMnO_4 . x 31500.
- 11 - Coupe longitudinale d'hyphe.
Anaérobiose. KMnO_4 . x 20700.
- 12 - Coupe longitudinale d'hyphe
Aérobiose en présence de 9-fluorénone
 KMnO_4 . x 15600.





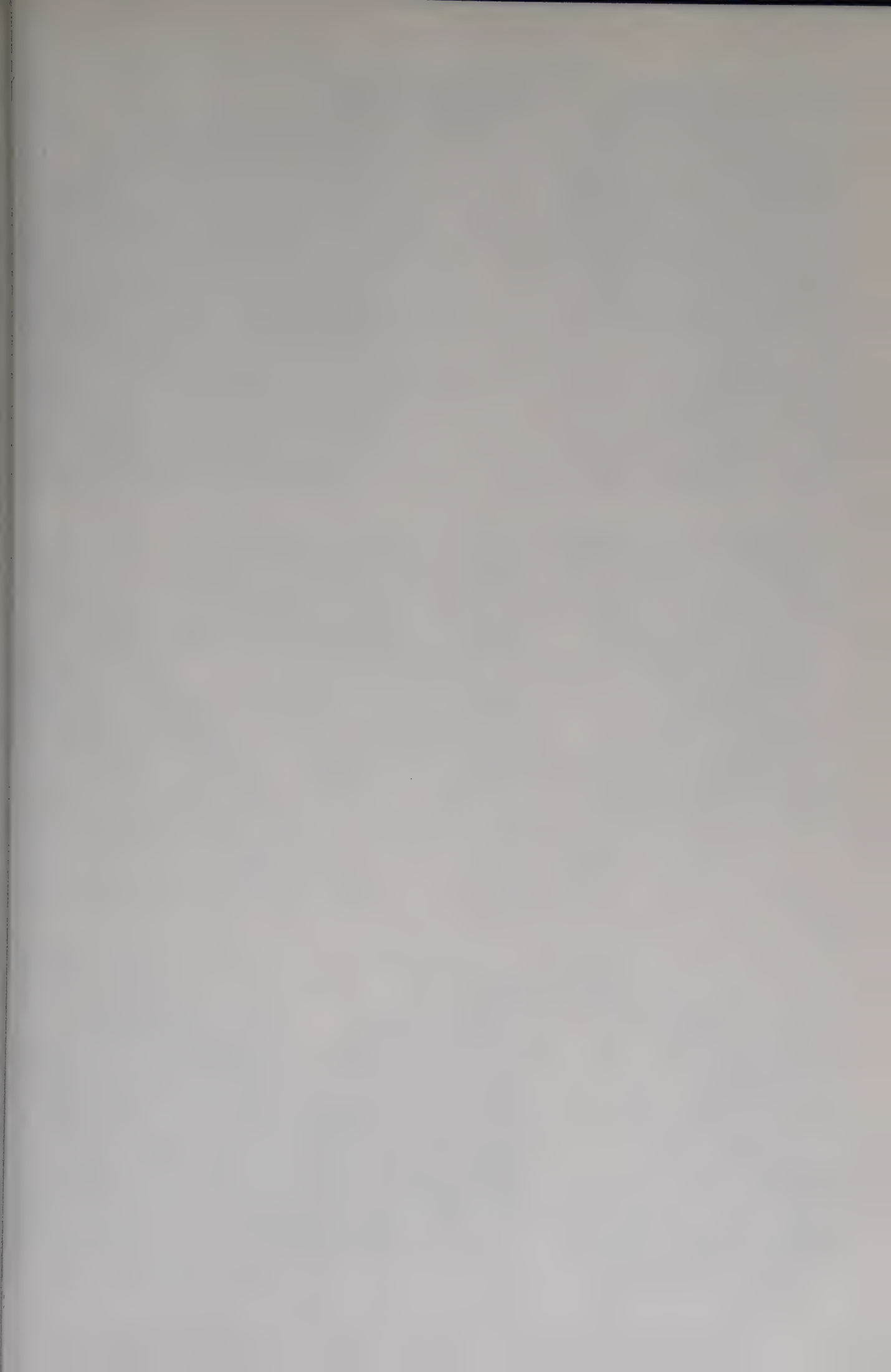
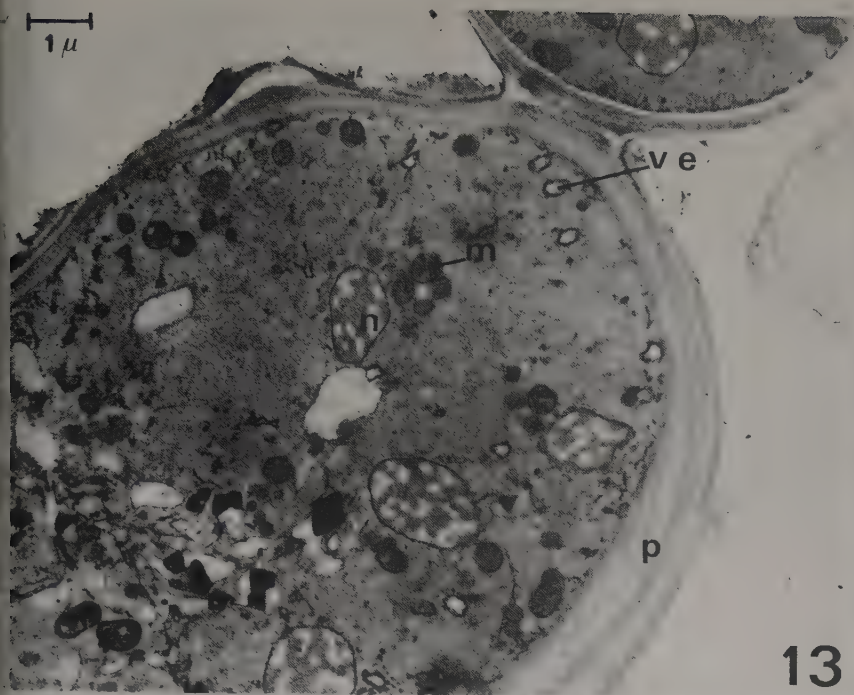


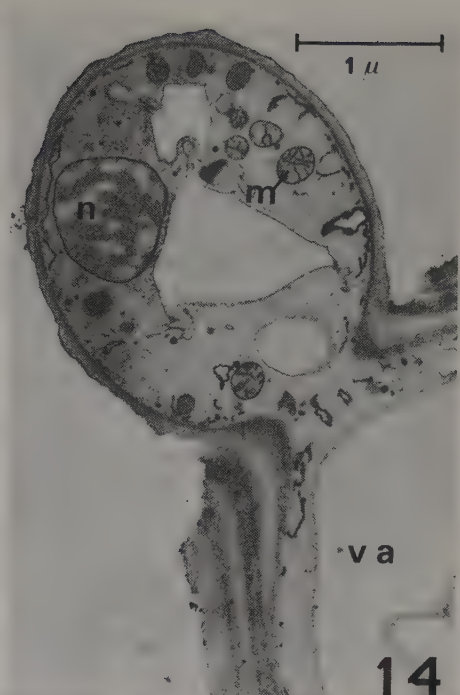
PLANCHE III

Formes levures de Mucor hiemalis (KMnO₄)

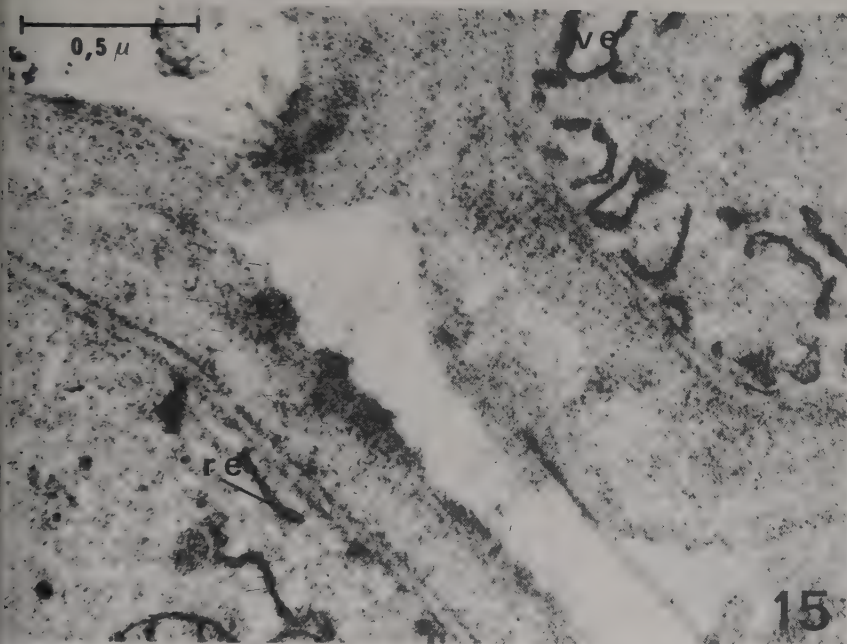
- 13 - Coupe d'une cellule levuriforme et de son bourgeon.
Anaérobiose en présence de 9-fluorénone. x 8000.
- 14 - Bourgeonnement d'une forme levure. x 19800.
- 15 - Formation de la zone d'abscission entre bourgeon et
cellule mère. x 46000.
- 16 - Germination d'une cellule levuriforme. x 19800.
- 17 - Tube germinatif avec septum. x 35700.
- 18 - Détail d'un septum. x 46000.



13



14



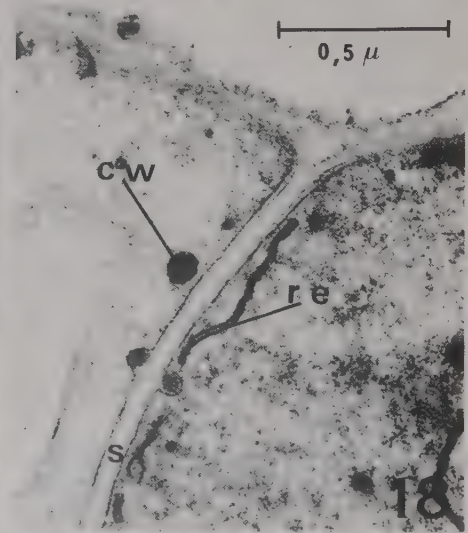
15



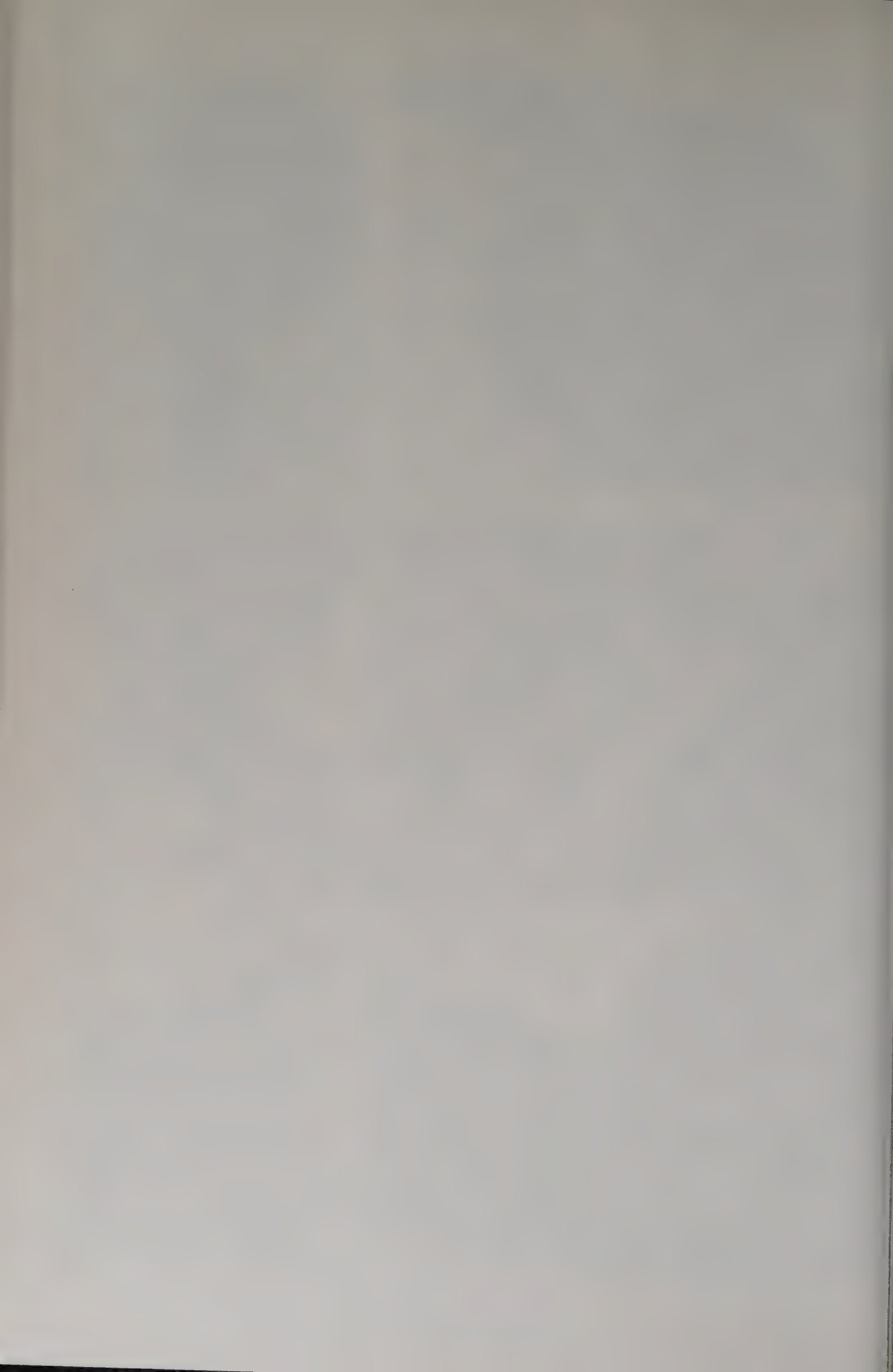
16



17



18



C O N C L U S I O N

Il est maintenant établi de façon certaine que le pyrophosphate de farnésyle (C_{15}) dont la dimérisation conduit au squalène (C_{30}), représente également un précurseur obligatoire dans l'élaboration des caroténoïdes. Ce composé subit en effet une condensation avec une molécule de pyrophosphate d'isopentényle (C_5) pour donner du pyrophosphate de géranylgéranyle (C_{20}) qui, par un mécanisme non encore élucidé, conduirait au premier précurseur en C_{40} des caroténoïdes. L'identité de celui-ci fait encore l'objet de nombreuses spéculations mais d'après certains auteurs, le prélycopersène ou le lycopersène, homologues supérieurs en C_{40} respectivement du présqualène et du squalène, seraient les premiers composés formés lors de la dimérisation du pyrophosphate de géranylgéranyle.

Nous avons recherché le lycopersène dans les cultures où la synthèse des caroténoïdes était pratiquement nulle et où l'on pouvait de ce fait espérer rencontrer une accumulation de précurseurs. Tous nos essais sont cependant restés infructueux et viennent s'ajouter à ceux, déjà nombreux, qui font mettre en doute le rôle du lycopersène dans la biosynthèse des caroténoïdes

La formation directe de phytoène à partir de pyrophosphate de géranylgéranyle a été envisagée et un mécanisme conduisant à la formation préférentielle de l'isomère cis a déjà reçu un début de vérification expérimentale. On sait toutefois depuis longtemps que l'immense majorité des caroténoïdes naturels présente une structure all-trans et il faut donc admettre que la structure cis du phytoène est perdue au cours d'une des étapes de désaturation.

L'étude de la stéréochimie des caroténoïdes isolés de Mucor hiemalis cultivé dans différentes conditions, nous a cependant permis de montrer pour la première fois de façon irréfutable que du phytoène-all-trans est synthétisé par ce microorganisme. Nous avons en outre isolé et caractérisé les isomères 13-cis et 13, 15-di-cis jusqu'alors inconnus.

L'accumulation de quantités suffisantes de ces isomères pour les études de configuration n'a été obtenue que grâce à l'inhibition, par de nouveaux composés, de la formation des polyènes colorés. Nous avons en effet recherché des substances douées de la meilleure spécificité possible vis-à-vis de la caroténogenèse et, à cette occasion, nous avons tenté de mettre en évidence quelle relation peut exister entre la structure moléculaire des composés étudiés et leur effet sur la pigmentation.

Parmi toutes les substances testées, seule une dizaine environ s'est révélée capable de bloquer totalement la pigmentation de M. hiemalis. Ce résultat est intéressant car d'une part, si de nouveaux inhibiteurs de la caroténogenèse ont été découverts, il a permis de montrer d'autre part que l'activité recherchée nécessite la présence dans la molécule de deux noyaux benzéniques fortement conjugués. D'autres exigences peuvent exister mais leur mise en évidence a été rendue particulièrement difficile par le fait que le champignon transforme, dans la plupart des cas, les composés introduits

dans le milieu de culture en dérivés qui restent parfois actifs sur la caroténogénèse mais aussi en dérivés totalement inactifs. Ce dernier cas est particulièrement bien illustré par la transformation du 2-hydroxybiphényle en un glucoside dépourvu d'activité. Au contraire, la diphénylamine passe en partie sous forme de 4-hydroxydiphénylamine qui possède elle-même une grande capacité d'inhibition de la pigmentation mais possède aussi une toxicité très marquée vis-à-vis de la multiplication cellulaire.

L'étude de l'influence de la lumière sur la caroténogénèse de nombreux microorganismes autres que photosynthétiques ou à pigmentation photoinduite, a déjà permis de noter que la synthèse des polyènes colorés est en général fortement augmentée lorsque les cultures sont soumises à une illumination plus ou moins intense.

Nous avons confirmé ce fait dans le cas des cultures normales de Mucor hiemalis mais de plus, nous avons mis en évidence une action importante de la lumière sur la synthèse du phytoène. On remarque en effet, surtout dans le cas des cultures réalisées en présence de différents inhibiteurs de la pigmentation, non seulement des variations considérables de la quantité de phytoène mais aussi des différences portant sur la nature des isomères en fonction de la quantité de lumière reçue par les cultures. Si en fin de croissance à l'obscurité les cultures accumulent uniquement du phytoène-15-cis, celles effectuées à la lumière renferment, au même stade de croissance, des proportions de phytoène-all-trans pouvant atteindre jusqu'à 70 % du phytoène total. Nous avons montré que cette proportion d'isomère trans a pour origine d'une part l'isomérisation probable du phytoène-cis sous l'influence des inhibiteurs et, d'autre part une synthèse enzymatique contrôlée par la cellule. Cet isomère ne représente donc pas un artéfact de culture comme le confirment d'ailleurs les expériences de levée d'inhibition au cours desquelles le phytoène-trans est en partie métabolisé.

Une certaine spécificité d'action a été attribuée à différents inhibiteurs de la caroténogenèse, mais des réactions secondaires plus ou moins nombreuses ont cependant été mises en évidence. La fluorénone est en revanche pratiquement sans action sur la synthèse des stérols ou des ubiquinones et nous n'avons noté au cours de la synthèse des lipides qu'une légère augmentation de la teneur en acide oléique.

On sait par ailleurs que l'oxygène est indispensable à la formation des caroténoïdes chez les champignons alors que la synthèse du phytoène par des extraits enzymatiques s'effectue avec de meilleurs rendements en anaérobiose.

Nos résultats ne laissent cependant aucun doute sur l'importance du rôle de l'oxygène dans la caroténogenèse de M.hiemalis. En effet, en anaérobiose, la synthèse des polyène colorés est totalement inhibée et celle du phytoène considérablement diminuée. Nous avons observé de plus l'existence de phytoène-trans dont la quantité est légèrement augmentée en présence de fluorénone mais dans des proportions qui restent très inférieures à celles obtenues en aérobiose avec le même inhibiteur. Il ne semble pas toutefois que cette diminution du phytoène soit accompagnée d'une accumulation de précurseur directs de celui-ci, mais en revanche nous avons mis en évidence du déhydrosqualène et surtout du squalène qui s'accumule par suite de la diminution très importante de la synthèse des stérols. La composition en acides gras des lipides isolés de cultures anaérobies subit également des modifications surtout caractérisées par une diminution très sensible du taux des acides gras insaturés aussi bien en présence qu'en absence de fluorénone. Au contraire, celui des acides gras saturés et tout particulièrement des acides gras à courte chaîne est considérablement augmenté.

Le mycélium d'une culture anaérobie, incubé dans un second temps en milieu tampon sous forte oxygénation, se colore assez rapidement par suite de la formation principalement de β -carotène. Cependant, la quantité totale de pigments néoformés ne dépasse jamais celle du phytoène accumulé durant l'anaérobiose et ceci tend à montrer qu'il n'existe pas de pool important de précurseurs du phytoène ou que les enzymes responsables de la synthèse de ce dernier sont pratiquement inopérants. En revanche, les mêmes conditions d'incubation ramènent la formation des stérols et celle des acides gras insaturés à des valeurs qui, bien que restant au-dessous de la normale, témoignent d'une transformation importante dans un cas du squalène, dans l'autre des acides gras saturés.

Le passage de l'aérobiose à l'anaérobiose ne se traduit pas chez notre souche de Mucor par des modifications morphologiques aussi prononcées que chez M.rouxii où les quelques autres espèces capables de se multiplier en absence d'oxygène. En effet, si les filaments mycéliens sont parfois terminés par de courtes chaînettes d'arthrospores, nous n'avons jamais mis en évidence dans ces conditions de cellules levuriformes; celles-ci constituent en revanche la presque totalité de la masse cellulaire dans les cultures effectuées en présence de fluorénone. Nous avons observé que les cellules levuriformes prennent naissance à partir d'arthrospores qui commencent par s'arrondir puis émettent un nombre variable de bourgeons qui se libèrent plus ou moins tôt suivant l'agitation du milieu. Aucune cellule intermédiaire semblable à celle décrite pour Mucor rouxii n'a été décelée.

La microscopie électronique révèle un certain nombre de particularités propres, semble-t-il, à ces cellules. En effet, la paroi dont l'épaisseur est en moyenne dix fois plus importante que celle de la forme mycélienne provenant de cultures aérobies effectuées en présence de fluorénone, représente certainement un des éléments les plus remarquables. En fait, on constate que la paroi s'épaissit à chaque bourgeonnement qui semble s'effectuer suivant un mode proche de celui connu chez Sterigmatomyces et non encore décrit chez les Phycomycètes; à signaler toutefois que dans le cas de Mucor hiemalis toutes les cellules y compris les jeunes bourgeons sont multinucléés.

Le passage de la forme mycélienne à la forme levure résulterait d'après certains auteurs d'une modification portant sur la stéréochimie des liaisons osidiques de la paroi. La rupture des ponts disulfure a été également invoquée pour expliquer la diminution de rigidité des parois et le remplacement d'une croissance apicale par une croissance isodiamétrique. Dans tous les cas, ces modifications ne sont pas permanentes puisque sous l'influence de l'oxygène les cellules levuriformes cessent de se multiplier et le bourgeonnement fait place à la germination. Au bout de quelques heures, un mycélium se développe et ce d'autant plus vite que la teneur en glucose est plus élevée.

La localisation des caroténoïdes au sein de la cellule fongique n'a fait l'objet, jusqu'à présent, que d'un nombre restreint de travaux dont les conclusions ne sont pas toujours concordantes. Chez Mucor hiemalis les globules lipidiques contiennent la majorité sinon la totalité des pigments et nous avons montré que ceux-ci ne se trouvent pas en simple solution dans les triglycérides. L'examen des globules lipidiques en microscopie électronique fait apparaître que ceux-ci sont entourés d'une membrane à un seul feuillet assez

comparable à celle décrite dans le cas des sphérosomes de végétaux supérieurs sous le nom de " demi-unité membranaire". En effet, la composition en acides aminés des protéines isolées des globules lipidiques de M.hiemalis présente une grande similitude avec celle des protéines membranaires isolées en particulier des mitochondries. Enfin, la formation de

β -carotène dans les globules lipidiques qui en sont initialement dépourvus, laisse supposer que les sphérosomes ne représentent pas seulement un lieu de stockage des pigments mais pourraient au contraire renfermer au moins en partie la chaîne enzymatique responsable de l'élaboration des caroténoïdes.

BIBLIOGRAPHIE

1. LIAAEN-JENSEN S., HERTZBERG S., WEEKS O.B & SCHWIETER U.
C₅₀-carotenoids. 3 - Structure determination of dehydro-
genans P-439.
(1968) Acta Chem.Scand., 22, 1171-1186.
2. HERTZBERG S & LIAAEN-JENSEN S.
The carotenoids of Mycobacterium phlei strain Vera.
2. The structure of the phleixanthophylls - two novel
tertiary glucosides.
(1967) Acta Chem. Scand., 21, 15-41.
3. KLEINIG H., REICHENBACH H. & ACHENBACH M.
Carotenoid pigments of Stigmatella aurantiaca (Chondromyces
aurantiacus). Acylated carotenoid glucosides.
(1970) Arch.Mikrobiol., 73, 223-234.
4. GOODWIN T.W.
(1971) Aspects of terpenoid chemistry and biochemistry,
(Goodwin T.W. ed.) chap. 11. Academic Press, London and
New-York.
5. EMERSON R. & FOX D.L
Y-carotene in the sexual phase of the aquatic fungus.
(1940) Proc.Roy.Soc., 128, 275-293.
6. SCHOPFER W.H.
Sur l'identification d'un caroténoïde de champignon.
(1935) C.R. Soc.Biol., 118, 3-5.
7. GARTON G.A., GOODWIN T.W. & LIJINSKY W.
Studies in carotenogenesis. I. General conditions governing
β-carotene synthesis by the fungus Phycomyces blakesleea-
nus Burgeff.
(1951) Biochem.J., 48, 154-163.
8. BURNETT J.H.
Carotene and sexuality in Mucoraceae, especially in
Phycomyces blakesleeanus.
(1956) New. Phytol., 55, 45-49.

9. LING-YOUNG M.

Etude des phénomènes de la sexualité chez les Mucorinées, suivie d'un appendice sur les Mucorinées d' Auvergne et spécialement les Mucorinées du sol.
(1929) Thèse. Paris.

10. TURIAN G.

Recherches sur l'action anticaroténogène de la diphénylamine et ses conséquences sur la morphogenèse reproductive chez Allomyces et Neurospora.
(1957) *Physiol. Plant.*, 10, 667-680.

11. GAGLIOTI L., CAINELLI G., CAMERINO B., MONDELLI R., PRIETO A., QUILICO A., SALVATORI T. & SELVA A.

The structure of trisporic-C acid.
(1966) *Tetrahedron (Suppl.)*, 7, 175-187.

12. GOODAY G.W.

The extraction of a sexual hormone from the mycelium of Mucor mucedo.
(1968) *Phytochem.*, 7, 2103-2105.

13. AUSTIN D.J., BU'LOCK J.D. & DRAKE D.

The biosynthesis of trisporic acids from β -carotene via retinal and trisporol.
(1970) *Experientia*, 26, 348-349.

14. HESSELTINE C.W. & ANDERSON R.F.

Zygospores and carotene produced by intraspecific and interspecific crosses of Choanephoraceae in liquid media.
(1957) *Mycologia*, 49, 449-452.

15. PAGE R.M. & CURRY G.M.

Studies on phototropism of young sporangiophores of Pilobolus kleinii.
(1966) *Photochem. Photobiol.*, 5, 31-40.

16. MEISSNER G. & DELBRUCK M.

Carotenes and retinal in Phycomyces mutants.
(1968) *Plant Physiol.*, 43, 1279-1283.

17. POPJÄK G. & CORNFORTH J.W.

Substrate stereochemistry in squalene biosynthesis.
(1966) *Biochem.J.*, 101, 553-568.

18. EPSTEIN W.W. & RILLING H.C.

Studies on the mechanism of squalene biosynthesis.
(1970) J. Biol. Chem., 245, 4597-4605.

19. SHAH D.V., FELDBRUEGGE D.H., HOUSER A.R. & PORTER J.W.

Conversion of ^{14}C -labeled geranylgeranyl pyrophosphate to phytoene by a soluble tomato plastid enzyme system.
(1968) Arch. Biochem. Biophys., 127, 124-131.

20. CHARLTON J.M., TREHARNE K.J. & GOODWIN T.W.

Incorporation of $[2-^{14}\text{C}]$ mevalonate into terpenoids by chloroplast preparations.
(1966) Biochem.J., 101, 7p.

21. WILLIAMS J.H., BRITTON G., CHARLTON J.M. & GOODWIN T.W.

The stereospecific biosynthesis of phytoene and polyunsaturated carotenes.
(1967) Biochem.J., 104, 767-777.

22. ALTMAN L.J., ASH L., KOWERSKI R.C., EPSTEIN W.W., LARSEN B.R., RILLING H.C., MUSCIO F. & GREGONIS D.E

Prephytoene pyrophosphate. A new intermediate in the biosynthesis of carotenoids.
(1972) J. Am. Chem. Soc., 9, 3257-3259.

23. QURESHI A.A., BARNES F.J., SEMMLER E.J. & PORTER J.W.

Biosynthesis of prelycopersene pyrophosphate and lycopersene by squalene synthetase.
(1973) J. Biol. Chem., 248, 2755-2767.

24. GROB E.C., KIRSCHNER K. & LYNEN F.

Neues Über die Biosynthese der Carotinoide.
(1961) Chimia, 15, 308-310.

25. DAVIES B.H., JONES D. & GOODWIN T.W.

The problem of lycopersene formation in Neurospora crassa.
(1963) Biochem.J., 87, 326-329.

26. NUSBAUM-CASSUTO E. & VILLOUTREIX J.

Mise en évidence du lycopersène chez les végétaux supérieurs.
(1965) C.R. Acad.Sci. Paris, 260, 1013-1015.

27. KUSHWAHA S.S. & KATES M.

Isolation and identification of bacteriorhodopsin and minor C₄₀ carotenoids in Halobacterium cutirubrum.
(1973) Biochim.Biophys. Acta, 316, 235-243.

28. PORTER J.W. & LINCOLN R.E.

Lycopersicon selections containing a high content of carotenes and colorless polyenes.
(1950) Arch. Biochem., 27, 390-403.

29. PORTER J.W. & ANDERSON D.G.

The biosynthesis of carotenes.
(1962) Arch. Biochem. Biophys., 97, 520-528.

30. DAVIES B.H. & REES A.F.

7',8',11',12'-tetrahydro- γ -carotene : a novel carotene from Phycomyces blakesleeanus.
(1973) Phytochem., 12, 2745-2750.

31. RABOURN W.J., QUACKENBUSCH F.W. & PORTER J.W.

Isolation and properties of phytoene.
(1954) Arch. Biochem. Biophys., 48, 267-274.

32. KOE B.K. & ZECHMEISTER L.

Preparation and spectral characteristics of all trans and a cis phytofluene.
(1953) Arch. Biochem. Biophys., 46, 100-104.

33. NASH H.A., QUACKENBUSCH F.W. & PORTER J.W.

Studies in the structure of zetacarotene.
(1948) J. Am.Chem.Soc., 70, 3613-3615.

34. HAXO F.

Studies on the carotenoid pigments of Neurospora.
(1949) Arch. Biochem., 20, 400-421.

35. SCHWIETER U., BOLLIGER H.R., CHOPARD-DIT-JEAN L.H., ENGLERT G., KOFLER M., KONIG A., PLANTA C.V., RUEGG R., VETTER W. & ISLER O.

Synthesen in der Carotinoid-Reihe : Physikalische Eigenschaften der Carotine.
(1965) Chimia, 19, 294-302.

36. RUEGG R., SCHWIETER U., RYSER G., SCHUDEL P. & ISLER O.

Synthesen in der Carotinoid-Reihe : Synthese von 7',8'-Dihydro- γ -carotin (β -zeacarotin) und 3',4'-Dehydro- γ -Carotin (Torulin).

(1961) Helvetica Chimica Acta, 117, 994-999.

37. HUBER W., ERWING G.W. & KRIGER J.

The absorption spectra of the vitamins and provitamins D.
(1945) J. Am. Chem. Soc., 67, 609-616.

38. ENTENMAN C.

Esterified fatty acids.

(1957) in Methods in Enzymology, (Colowick S.P. & Kaplan N.O. Ed.) vol III, pp. 323-325, Academic Press, New York.

39. BISERTE G., SEZILLE G., BERTRAND M. & JAILLARD J.

Exploration lipidique au cours du diabète.

(1964) Ann. Biol. Chim., 22, 861-897.

40. LAVATE W.V., DYER J.R., SPRINGER C.M & BENTLEY R.

The isolation, characterization and general properties of a partly reduced coenzyme Q₁₀ from Penicillium stipitatum.

(1965) J. Biol. Chem., 210, 524-531.

41. POWLS R. & HEMMING F.W.

The biosynthesis of quinones from p-hydroxybenzoic acid in Euglena gracilis var. bacillaris.

(1966) Phytochem., 5, 1249-1255.

42. PEEL J.L.

The separation of flavins by paper electrophoresis and its application to the examination of the flavin contents of microorganisms.

(1958) Biochem.J., 69, 403-416.

43. BURCH H.B.

Fluorimetric assay of FAD, FMN and riboflavin.

(1957) in Methods in Enzymology, (Colowick S.P & Kaplan N.O Ed.), vol. III, pp. 960-962, Academic Press, New York.

44. GUERIN B.

Etude de la flavinogenèse chez Saccharomyces cerevisiae
en fonction des différentes conditions de culture.
(1970) Bull. Soc. Chim. Biol., 52, 799-810.

45. LOWRY O.H., ROSEBROUGH M.J., FARR M.J. & RANDALL A.L.

Protein measurements with the Folin phenol reagents.
(1951) J. Biol. Chem., 193, 265-275.

46. DAVIS J.B., JACKMAN L.M., SIDDON P.T. & WEEDON B.C.L.

The structure and synthesis of phytoene, phytofluene,
ζ-carotene and neurosporene.
(1966) J. Chem. Soc., 2154-2165.

47. MAGOON E.F. & ZECHMEISTER L.

On a cis-neurosporene ex Pyracantha and the in vitro
stereoisomerization of neurosporene.
(1957) Arch. Biochem. Biophys., 68, 263-269.

48. CLAES H. & NAKAYAMA T.O.M.

Isomerization of poly-cis-carotenes by chlorophyll in vivo
and in vitro.
(1959) Nature, 183, 1053.

49. RAU W. & ZEHENDER C.

Die Carotinoide von Fusarium aquaeductum Lagh.
(1959) Arch. Mikrobiol., 32, 423-428.

50. MASE Y., RABOURN W.J. & QUACKENBUSCH F.W.

Carotene production by Penicillium sclerotiorum.
(1957) Arch. Biochem. Biophys., 68, 150-156.

51. HERBER R., MAUDINAS B., VILLOUTREIX J. & GRANGER P.

Formation de phytoène-all-trans chez Mucor hiemalis.
(1972) Biochim. Biophys. Acta, 280, 194-202.

52. JUNGALWALA F.B. & PORTER J.W.

The configuration of phytoene.
(1965) Arch. Biochem. Biophys., 110, 291-299.

53. WEEKS O.B., ANDREWES A.G., BROWN B.O & WEEDON B.C.L.

Occurrence of C₄₀ and C₄₅ carotenoids in the C₅₀ carotenoid
system of Flavobacterium dehydrogenans.
(1969) Nature, 224, 879-882.

54. ZECHMEISTER L.

(1962) in *Cis-trans isomeric carotenoids vitamins A and arylpolyenes* pp. 69.
Wien, Springer Verlag.

55. GRANGER P., MAUDINAS B., HERBER R. & VILLOUTREIX J.

^1H and ^{13}C NMR spectra of cis-and trans-phytoene isomers.
(1973) *J. Magn. Resonance*, 10, 43-50.

56. VETTER W., ENGLERT G., RIGASSI N. & SCHWIETER U.

(1971) in " *Carotenoids* " (Isler O., Ed.) chap.IV,
pp. 236. Birkhäuser Verlag, Basel.

57. KHATOON N., LOEBER D.E., TOUBE T.P & WEEDON B.C.L.

Stereochemistry in phytoene.
(1972) *Chem. Commun.*, 996-997.

58. JAUTELAT M., GRUTZNER J.B. & ROBERTS J.D.

Natural abundance of ^{13}C nuclear magnetic resonance
spectra of terpenes and carotenes.
(1970) *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 65, 288-292.

59. DORMAN D.E., JAUTELAT M. & ROBERTS J.D.

Carbone 13 nuclear magnetic resonance spectroscopy.
Quantitative correlations of the carbon chemical shifts
of acyclic alkenes.
(1971) *J. Org. Chem.*, 36, 2757-2766.

60. AUNG THAN, BRAMLEY P.M., DAVIES B.H. & REES A.F.

Stereochemistry of phytoene.
(1972) *Phytochem.*, 11, 3187-3192.

61. VALADON L.R.G., HERBER R., VILLOUTREIX J. & MAUDINAS B.

Cis-and trans-phytoene in *Verticillium agaricinum*.
(1973) *Phytochem.*, 12, 161-163.

62. KUSHWAHA S.C., PUGH E.L., KRAMER J.K. & KATES M.

Isolation and identification of dehydrosqualene and C_{40} -
carotenoid pigments in *Halobacterium cutirubrum*.
(1972) *Biochim. Biophys. Acta*, 260, 492-506.

63. GREGONIS D.E. & RILLING H.C.

Photoinduced prephytoene pyrophosphate synthesis in a
Mycobacterium sp.
(1973) *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 54, 449-454.

64. KOE B.K. & ZECHMEISTER L.

Preparation and spectral characteristics of all-trans and cis-phytofluene.
(1953) Arch. Biochem. Biophys., 46, 100-104.

65. KUSHWAHA S.C., SUZUE G., SUBBARAYAN C. & PORTER J.W.

The conversion of phytoene-¹⁴C to acyclic, monocyclic and dicyclic carotenes and the conversion of lycopene-15,15'-³H to mono and dicyclic carotenes by soluble enzyme systems obtained from plastids of tomato fruits.
(1970) J. Biol. Chem., 245, 4708-4717.

66. TURIAN G.

Recherches sur la biosynthèse des caroténoïdes chez un bacille paratuberculeux. 3. Inhibition de la pigmentation par la diphénylamine.
(1950) Helv. Chim. Acta, 33, 1988-1993.

67. GOODWIN T.W.

Studies in carotenogenesis. III. Identification of the minor polyene components of the fungus Phycomyces blakesleeana and a study of their synthesis under various cultural conditions.
(1952) Biochem. J., 50, 550-558.

68. VILLOUTREIX J.

Influence de divers agents chimiques sur la caroténogénèse de Rhodotorula mucilaginosa.
(1960) Biochim. Biophys. Acta, 40, 434-441.

69. RILLING H.G.

A study of inhibition of carotenoid synthesis.
(1965) Arch. Biochem. Biophys., 110, 39-46.

70. HERBER R., MAUDINAS B. & VILLOUTREIX J.

Influence de différents composés chimiques sur la caroténogénèse de Mucor hiemalis.
(1972) Phytochem., 11, 3461-3464.

71. NINET L., RENAUT J. & TISSIER R.

Activation of the biosynthesis of carotenoids by Blakeslea trispora.
(1969) Biotechnol. Bioeng., 11, 1195-1210.

72. HOWES C.D. & BATRA P.P

Accumulation of lycopene and inhibition of cyclic carotenoids in Mycobacterium in the presence of nicotine.
(1970) Biochim. Biophys. Acta, 222, 174-179.

73. LILLY V.G., BARNETT H.L & KRAUSE R.F.

The production of carotene by Phycomyces blakesleeana
(1960) Bull. 441 T. West Virginia University agricultural Experiment station.

74. BONALY R.

Biosynthèse des caroténoïdes cycliques de levures du genre Rhodotorula.
(1967) Thèse Sciences. Nancy.

75. HERBER R., LEPAGE M., PIERFITTE M & VILLOUTREIX J.

Métabolismes de quelques dérivés phénoliques chez Mucor hiemalis.
(1972) C.R. Soc. Biol., 166, 1087-1090.

76. ARCOS J.C. & ARCOS M.

(1962) in Fortschritte der Arzneimittelforschung,
(Jucker E. Ed.), pp.407, Birkhäuser Verlag, Basel.

77. FAULKNER G.H.

The antibacterial action of some diphenyl derivatives.
(1944) Biochem.J., 38, 370-372.

78. ITIER J. & CASADEVALL A.

Conjugaison de l'atome d'azote dans des systèmes aromatiques polynucléaires non condensés. II. Etude ultraviolette comparée de la diphenylamine et de ses dérivés analogues.
(1969) Bull. Soc. Chim. Fr., 7, 2355-2363.

79. LIAAEN-JENSEN S., COHEN-BAZIRE G., NAKAYAMA T.O.M & STANIER R.Y.

The path of carotenoid synthesis in a photosynthetic bacterium.
(1958) Biochim. Biophys. Acta, 29, 477-498.

80. NUSBAUM-CASSUTO E.

Recherches sur la biosynthèse des caroténoïdes.
(1967) Thèse Sciences. Nancy.

81. RAU W., LINDEMANN I. & RAU-HUND A.

Light-dependant carotenoid synthesis.
Pigment production of Neurospora crassa in submerged culture.
(1968) Planta, 80, 309-316.

82. BINDL E., LANG W. & RAU W.

Time course of synthesis of various carotenoids in Fusarium aquaeductum after various inductive treatments.
(1970) Planta, 94, 156-174.

83. VALADON G. & MUMMERY R.

Effect of light on nucleic acids, protein and carotenoids of Verticillium agaricinum.
(1971) Microbios, 4, 227-240.

84. HOWES C.D., BATRA P.P. & BLAKELEY C.F.

Absolute requirement for oxygen during illumination for photoinduced carotenoid synthesis.
(1969) Biochim. Biophys. Acta, 189, 298-299.

85. CHICHESTER C.O., WRONG P. & MACKINNEY G.

On the biosynthesis of carotenoids.
(1954) Plant Physiol., 29, 238-241.

86. MASE Y., RABOURN W.J. & QUACKENBUSCH F.W.

Carotene production by Penicillium sclerotiorum.
(1957) Arch. Biochem. Biophys., 68, 150-156.

87. WEEKS O.B. & GARNER R.J.

Biosynthesis of carotenoids in Flavobacterium dehydrogenans Arnaudi.
(1967) Arch. Biochem. Biophys., 121, 35-49.

88. MAUDINAS B., HERBER R. & VILLOUTREIX J.

Photoisomérisation du phytoène par la 9-fluorénone.
(1972) Photochem. Photobiol., 16, 515-518.

89. HAMMOND G.S., TURRO N.J. & LEERMAKERS P.A.

The mechanisms of photoreactions in solution.
IX - Energy transfer from the triplet states of aldehydes and ketones to unsaturated compounds.
(1962) J. Phys. Chem., 66, 1144-1147.

90. MAUDINAS B., LAND E.J. & BENSASSON R.
Travaux non publiés.
91. DAVIES B.H., VILLOUTREIX J., WILLIAMS R.J.H. & GOODWIN T.W.
The possible role of β -zeacarotene in carotenoid synthesis.
(1963) Biochem. J., 89, 96 P.
92. DAVIES B.H.
Carotenoids other than vitamin A. III (Cluj 1972).
p. 1-28. London Butterworths.
93. YOKOYAMA H., NAKAYAMA T.O.M & CHICHESTER C.O.
Biosynthesis of β -carotene by cell-free extracts of Phycomyces blakesleeen.
(1962) J. Biol. Chem., 237, 681-686.
94. HAMMOND R.K. & WHITE D.C.
Inhibition of vitamin K₂ and carotenoid synthesis in Staphylococcus aureus by diphénylamine.
(1970) J. Bact., 103, 611-615.
95. CHO K.Y., CORPE W.A. & SALTON M.R.J.
Effect of diphenylamine on the fatty acid composition of some bacterial lipids.
(1964) Biochem.J., 93, 26c-28c.
96. REHM H.J. & BATLES A.
Antimicrobial activity of biphenyl and its derivatives. Their effect on carbohydrate metabolism enzymes.
(1968) Z. Lebensm. Unters.Forsch., 137, 295-303.
97. SHAW R.
The occurrence of γ -linolenic acid in fungi.
(1965) Biochim. Biophys. Acta, 98, 230-237.
98. BAKER N. & LYNEN F.
Factors involved in fatty acyl CoA desaturation by fungal microsomes.
The relative roles of acyl CoA and phospholipids as substrates.
(1971) Eur. J. Biochem., 19, 200-210.

99. HOWLING D., MORRIS L.J., GURR M.I. & JAMES A.T.

The specificity of fatty acid desaturases and hydroxylases. The dehydrogenation and hydroxylation of mono-
enic acids.

(1972) Biochim. Biophys. Acta, 260, 10-19.

100. BICKERSTAFFE R. & ANNISON E.F.

Lipid metabolism of perfused chicken liver.

The uptake and metabolism of oleic acid, elaidic acid,
cis-vaccenic acid, trans-vaccenic acid and stearic
acid.

(1970) Biochem.J., 118, 433-442.

101. WEETE J.D.

Sterols of the fungi : Distribution and biosynthesis.

(1973) Phytochem., 12, 1843-1864.

102. OLSON J.A. & KNIZLEY H.

The effect of diphenylamine on carotenoid, sterol and
fatty acid synthesis in Phycomyces blakesleeana.

(1962) Arch. Biochem. Biophys., 97, 138-145.

103. Mc CORKINDALE N.J., HUTCHINSON S.A., PURSEY B.A.,
SCOTT W.T. & WHEELER R.

A comparison of the types of sterol found in species
of the Saprolegniales and Leptomitales with those found
in some other Phycomycetes.

(1969) Phytochem., 8, 861-867.

104. SUGIMURA T. & RUDNEY H.

The effect of aerobiosis and diphenylamine on the content
of ubiquinone in Rhodospirillum rubrum.

(1962) Biochim. Biophys. Acta, 62, 167-170.

105. MAUDINAS B.

Influence du 2-hydroxybiphényle sur la caroténogenèse et
la morphologie de Rhodopseudomonas spheroides et de
Rhodospirillum rubrum.

(1973) Thèse Sciences, Nancy.

106. NUSBAUM-CASSUTO E. & VILLOUTREIX J.

Influence de l'ubiquinone sur la caroténogenèse chez
les levures du genre Rhodotorula.

(1967) Bull.Soc.Chim.Biol., 49, 879-887.

107. LAVATE W.V. & BENTLEY R.

Distribution of normal isoprenologs of coenzyme Q and dihydrocoenzyme Q₁₀ in various molds.
(1964) Arch. Biochem. Biophys., 108, 287-291.

108. GORDON-WALKER A. & RADDA G.K.

Flavin-photosensitized reactions of retinol and stilbene.
(1970) Biochem.J., 120, 673-681.

109. BURNETT J.H.

(1965) In chemistry and biochemistry of plant pigments.
(Goodwin T.W. ed.), pp.382, Academic Press, London and New York.

110. GOODWIN T.W., JAMIKORN M. & WILLMER J.S.

Further observations concerning the action of diphenylamine in inhibiting the synthesis of β -carotene in Phycomyces blakesleeianus.
(1953) Biochem.J., 53, 531-538.

111. WICKERHAM L.J., FLICKINGER M.H. & JOHNSTON R.M.

The production of riboflavin by Ashbya gossypii.
(1946) Arch.Biochem., 9, 95-98.

112. CHENOUDA M.S.

Chemical composition of the cell walls of carotenogenesis and non-carotenogenesis forms of (-) strain of Blakeslea trispora.
(1972) J. Gen. Appl. Microbiol., 18, 143-153.

113. VAIL W.L. & LILLY V.G.

The location of carotenoid pigments and thickness of the cell wall in light and dark grown cells of Dactyopanax spathularia.
(1968) Mycologia, 60, 902-907.

114. WITTMAN H.

Untersuchungen über die Veränderung der Carotinoid Komponenten von Rhodotorula rubra in Abhängigkeit von Ernährungsbedingungen.
(1957) Arch. Mikrobiol., 25, 373-391.

115. BARNICKI-GARCIA S. & LIPPMAN E.

The bursting tendency of hyphal tips of fungi : presumptive evidence for a delicate balance between wall synthesis and wall lysis in apical growth.
(1972) J. Gen. Microbiol., 73, 486-500.

116. MAUDINAS B., DELZE J., VILLOUTREIX J. & REISINGER O.

The influence of 2-hydroxybiphenyl on membranes of Rhodospirillum rubrum.
(1973) Arch.Mikrobiol., 93, 219-228.

117. GROB E.C.

Über die Bildung der Carotinoide bei Neurospora crassa.
(1958) Chimia, 12, 86-88.

118. ZALOKAR M.

Studies on biosynthesis of carotenoids in Neurospora crassa.
(1954) Arch. Biochem., 50, 71-80.

119. HARDING R.W., HUANG P.C. & MITCHELL H.K.

Photochemical studies of the carotenoid biosynthetic pathway in Neurospora crassa.
(1969) Arch. Biochem. Biophys., 129, 696-707.

120. LANG W. & RAU W.

Untersuchungen über die lichtabhängige Carotinoid-synthese. IX - Zum Induktions mechanismus der carotinoidbildenden Enzyme bei Fusarium aquaeductum.
(1972) Planta, 106, 345-354.

121. SUBBARAYAN C., KUSHWAHA S.C., SUZUE G. & PORTER J.W.

Enzymatic conversion of isopentenyl pyrophosphate-4-¹⁴C and phytoene-¹⁴C to acyclic carotenes by an ammonium sulfate-precipitated spinach enzyme system.
(1970) Arch. Biochem. Biophys., 137, 547-557.

122. BARNICKI-GARCIA S. & NICKERSON W.J.

Induction of yeastlike development in Mucor by carbon dioxide.
(1962) J. Bact., 84, 829-840.

123. GORDON P.A., STEWART P.R. & CLARK-WALKER G.D.

Fatty acid and sterol composition of Mucor genevensis in relation to dimorphism and anaerobic growth.
(1971) J. Bact., 107, 114-120.

124. ANDREASEN A.A. & STIER T.J.B.

Anaerobic nutrition of Saccharomyces cerevisiae.
I - Ergosterol requirement for growth in a defined medium.
(1953) J. Cell. Comp. Physiol., 41, 23-26.

125. ANDREASEN A.A. & STIER T.J.B.

Anaerobic nutrition of Saccharomyces cerevisiae.
II - Unsaturated fatty acid requirement for growth in a defined medium.
(1954) J. Cell. Comp. Physiol., 43, 271-281.

126. LYNCH J.M.

Identification of substrates and isolation of micro-organisms responsible for ethylene production in the soil.
(1972) Nature, 240, 45-46.

127. TUNG-CHING LEE, LEE T.H & CHICHESTER C.O.

Phytoene biosynthesis : possible mechanisms for the coupling of geranylgeranyl pyrophosphate.
(1972) Phytochem., 11, 681-687.

128. SUZUE G., TSUKADA K. & TANAKA S.

Occurrence of dehydrosqualene (C₃₀ phytoene) in Staphylococcus aureus.
(1968) Biochim. Biophys. Acta, 164, 88-93.

129. KUSHWAHA S.C., PUGH E.L., KRAMER J.K.G. & KATES M.

Isolation and identification of dehydrosqualene and C₄₀ carotenoid pigments in Halobacterium cutirubrum.
(1972) Biochim. Biophys. Acta, 260, 492-506

130. JOLLOU D., KELLERMAN G.M. & LINNANE A.W.

The biogenesis of mitochondria.
III - The lipid composition of aerobically and anaerobically grown Saccharomyces cerevisiae as related to the membrane systems of the cells.
(1968) J. Cell. Biol., 37, 221-230.

131. SOBEL H., MARMORSTON J. & ARZANGOOLIAN H.

The fungistatic action of squalene on certain Dermatophytes in vitro.
(1954) Science, 119, 816-817.

132. BLOOMFIELD D.K. & BLOCH K.

The formation of Δ^9 -unsaturated fatty acid.
(1960) J. Biol. Chem., 235, 337-345.

133. LENNARZ W.J., SCHEUERBRANDT G. & BLOCH K.

The biosynthesis of oleic and 10-méthylstearic acids
in Mycobacterium phlei.
(1962) J. Biol. Chem., 237, 664-671.

134. MEYER F. & BLOCH K.

Effect of temperature on the enzymatic synthesis of
unsaturated fatty acids in Torulopsis utilis.
(1963) Biochim. Biophys. Acta, 77, 671-673.

135. BAIL T.

Ueber Hefe
(1857) Flora, 417-444.

136. PASTEUR L.

Etudes sur la bière.
(1876) Gauthier Villars Ed., Paris.

137. WASTON K., HASLAM J.M. & LINNANE A.W.

Biogenesis of mitochondria. XIII - The isolation of
mitochondrial structures from anaerobically grown
Saccharomyces cerevisiae.
(1970) J. Cell. Biol., 46, 88-96

138. HOWELL N., ZUICHES C.A. & MUNKRES K.D.

Mitochondrial biogenesis in Neurospora crassa.
I - An ultrastructural and biochemical investigation
of the effects of anaerobiosis and chloramphenicol
inhibition.
(1971) J. Cell. Biol., 50, 721-736.

139. PLATTNER H. & SCHATZ G.

Promitochondria of anaerobically grown yeast.
Morphology.
(1964) Biochemistry, 8, 339-343.

140. BARTNICKI-GARCIA S.

Symposium on biochemical bases of morphogenesis in fungi
III - Mold-yeast dimorphism of Mucor.
(1963) Bacteriol. Rev., 27, 293-304.

141. GROVE S.N., OUJERDSKY K.B. & SZANISZLO P.J.

Budding in the dimorphic fungus Phialophora dermatitidis.
(1973) J. Bact., 115, 323-329.

142. NICKERSON N.S. & FALCONE G.

Identification of protein disulfide reductase as a
cellular division enzyme in yeasts.
(1956) Science, 124, 722-723.

143. KREGER-VAN RIJ N.J.W. & VEENHUIS M.

A comparative study of the cell wall structure of basidio-
mycetous and related yeasts.
(1971) J. Gen. Microbiol., 68, 87-95.

144. CLARK-WALKER G.D.

Development of respiration and mitochondria in Mucor
genevensis after anaerobic growth. Absence of glucose
repression.
(1972) J. Bact., 109, 399-408.

145. GARRISON R.G., LANE J.W. & FIELD M.F.

Ultrastructural changes during the yeastlike to mycelial-
phase conversion of Blastomyces dermatitidis and
Histoplasma capsulatum.
(1970) J. Bact., 101, 628-635

146. HAWKER L.E. & GOODAY M.A.

Delimitation of the gametangia of Rhizopus sexualis
(Smith) Callen : an electron microscope study of
septum formation.
(1967) J. Gen. Microbiol., 49, 371-376.

147. WERGIN W.P.

Development of Woronin bodies from microbodies in
Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici.
(1973) Protoplasma, 76, 249-260.

148. DUJEZDSKY K.B., GROVE S.N. & SZANISZLO P.J.

Morphological and structural changes during the yeast-
to-mold conversion of Phialophora dermatitidis.
(1973) J. Bact., 113, 468-477.

149. NADSON G. & PHILIPOV G.

Une nouvelle Mucorinée Mucor guillermondii nov.sp. et
ses formes levures.
(1925) Rev. Gén. Bot., 37, 450-461.

150. TERENCE H.F. & STORCK R.

Stimulation of fermentation and yeast-like morphogenesis in Mucor rouxii by phenethyl alcohol.
(1969) J. Bact., 97, 1248-1261.

151. FISHER D.J., PRING R.J., RICHMOND D.V. & MICHAEL A.

The production of yeast-like forms of Mucor by antibiotics and fungicides.
(1972) J. Gen. Microbiol., 73, XIV.

152. BARNICKI-GARCIA S. & NICKERSON W.J.

Isolation, composition and structure of cell walls of filamentous and yeast-like forms of Mucor rouxii.
(1962) Biochim. Biophys. Acta, 58, 102-119.

153. KANETSUNA F. & CARBONELL L.M.

Cell wall composition of the yeast-like and mycelial forms of Blastomyces dermatitidis.
(1971) J. Bact., 106, 946-948.

154. KANETSUNA F., CARBONELL L.M., AZUMA I. & YAMAMURA Y.

Biochemical studies on the thermal dimorphism of Paracoccidioides brasiliensis.
(1972) J. Bact., 110, 208-218.

155. BARTNICKI-GARCIA S. & LIPPMAN E.

Fungal morphogenesis : cell wall construction in Mucor rouxii.
(1969) Science, 165, 302-303.

156. CHEESMAN D.F., LEE W.L. & ZAGALSKY P.F.

Carotenoproteins in invertebrates.
(1967) Biol. Rev., 42, 131-160.

157. SCHOPFER W.H.

Recherches sur la sexualité des champignons. Le problème de la biochimie comparée du sexe.
(1928) Bull. Soc. Bot. Genève Sér. II, 20, 149-323.

158. HEIM P.

Sur la localisation des pigments carotiniens chez les Phalloïdées.
(1946) C.R. Acad. Sci., 222, 1354-1355.

159. TURIAN G.

Identification du lycopène dans le réceptacle fructifère du gastéromycète Anthurus aseroiformis.
(1955) C.R. Acad. Sc., 241, 764-765.

160. SCHRANTZ J.P.

Etude au microscope électronique de la localisation des pigments caroténoïdes chez un Discomycète : Ciliaria hirta (Schum.) Boudier.
(1965) Rev. Cytol. Biol. Veg., 28, 31-37.

161. VAIL W.J. & LILLY V.G.

The location of carotenoid pigments and thickness of the cell wall in light- and dark-grown cells of Dacryopinax spathularia.
(1968) Mycologia, 60, 902-907.

162. NEUPERT W. & LUDWIG G.D.

Sites of biosynthesis of outer and inner membrane proteins of Neurospora crassa mitochondria.
(1971) Eur. J. Biochem., 19, 523-532.

163. MATILE P., MODR H. & ROBINOW C.F.

(1969) in The Yeast (Rose A.H. & HARRISON J.S. ed.), vol.I, pp. 248, Academic Press, London and New York.

164. YATSU L.Y. & JACKS T.J.

Spherosome membranes. Half unit-membranes.
(1972) Plant Physiol., 49, 937-943.

165. TAE H.J., HESS J.L. & BENSON A.A.

(1968) in Comparative biochemistry and biophysics of photosynthesis (Shibata K., Takamiya A., Jagendorf A.T & Fuller R.C.) pp.36-49, University Park Press. University of Tokyo Press.

166. ZALOKAR M.

Intracellular centrifugal separation of organelles in Phycomyces.
(1969) J.Cell.Biol., 41, 494-509.

167. COSTES C. & DEROCHE M.A.

Hétérogénéité des caroténoïdes dans les feuilles vertes.
(1965) C.R. Acad. Sc., 261, 4893-4896.

168. ZILVERSMIT D.B.

The surface coat of chylomicrons : lipid chemistry.
(1968) J. Lipid Res., 9, 180-186.

169. YATSU L.Y., JACKS T.J. & HENSARLING T.P.

Isolation of sphaerosomes (Oleosomes) from onion,
cabbage and cotton seed tissues.
(1971) Plant Physiol., 48, 675-682.

170. LASETER J.L. & WEETE J.D.

Fatty acid ethyl esters of Rhizopus arrhizus
(1971) Science, 172, 864-865.

171. WOODWARD D.O. & MUNKRES K.D.

Alterations of a maternally inherited mitochondrial
structural protein in respiratory-deficient strains
of Neurospora.
(1966) Proc. Nat. Acad. Sc., 55, 872-880.

172. SUBDEN R. & TURIAN G.

A mechanism for carotenoid synthesis in fungi involving
a multifunctional enzyme complex.
(1970) Mol. Gen. Genet., 108, 358-364.

Nom de l'étudiant : HERBER Régine

Nature de la thèse : Doctorat es-Sciences Naturelles

Vu, Approuvé et
Permis d'Imprimer

Nancy, le 19 juillet 1974

Le Président du Conseil
de l'Université I de Nancy

